



SÍNTESIS DE UN DERIVADO DEL DIPÉPTIDO Val-Trp Y ESTUDIO DE SU AGREGACIÓN PARA DAR GELES Y NANOGELES

Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales

Departamento de Química Inorgánica y Orgánica

Grupo de Química Supramolecular

Bárbara Adsuaara Rius

Trabajo Final de Máster

Castelló de la Plana, Julio 2019

Abreviaturas

RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
d	Doblete
t	Triplete
m	Multiplete
dd	Doble doblete
MHz	Megahercios
ppm	Partes por millón (desplazamiento químico)
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropiletilamina
CHCl ₃	Cloroformo
H ₂	Hidrógeno gas
Pd/C	Catalizador de paladio sobre carbono
THF	Tetrahidrofurano
MeOH	Metanol
HCl	Ácido clorhídrico
AcOEt	Acetato de etilo
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
°C	Grados centígrados
mg	Miligramos
h	hora
%	Tanto por cien
g	Gramo
mL	Mililitro
eq.	Equivalentes

μL	Microlitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
c.m.g.	Concentración mínima de gelación
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
Trp	Triptófano
Val	Valina
ZTrpOH	((benciloxi) carbonil)-L-triptófano
ZTrpPr	bencil (S)-(3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(propilamino) propan-2-il) carbamato (ZTrpPr)
HTrpPr	(S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)-N-propilpropanamida
ZValTrpPr	bencil ((S)-1-(((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(propilamino) propan-2-il) amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato
HValTrpPr	(S)-N-(((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(propilamino) propan-2-il)-2-amino-3-metilbutanamida
SucValTrpPr	ácido 4-(((S)-1-(((S)-3-(1H-indol-3-il)-1-oxo-1-(propilamino) propan-2-il) amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il) amino)-4-oxobutanoico
(SucValTrp) ₂ Hx	Ácido (6R, 9R, 19S, 22S)-9, 19-bis((1H-indol-3-il) metil)-6, 22-diisopropil-4, 7, 10, 18, 21, 24-hexaoxo-5, 8, 11, 17, 20, 23-hexaazaheptacosanedioico

El Dr. Juan Felipe Miravet Celades, Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana, y el Dr. César Augusto Angulo Pachón, Investigador de la Universitat Jaume I,

CERTIFICAN

Que el trabajo fin de master con el título **SÍNTESIS DE UN DERIVADO DEL DIPÉPTIDO Val-Trp Y ESTUDIO DE SU AGREGACIÓN PARA DAR GELES Y NANOGELES** ha sido realizado por Bárbara Aduara Rius bajo su dirección, en el grupo de Química Supramolecular del Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I de Castellón de la Plana.

Lo que certificamos a los efectos oportunos en Castellón de la Plana a 22 de Julio de 2019.

Fdo. Dr. Juan F. Miravet Celades

Fdo. Dr. César A. Angulo Pachón

Agradecimientos

Primero quería dar las gracias a Dr. Juan F. Miravet, el supervisor de este trabajo, por el tiempo que me ha dedicado durante estos meses.

Al Dr. César A. Angulo Pachón, muchas gracias por estar conmigo durante este tiempo, por todo lo que me ha enseñado y por todo el tiempo que me has dedicado siempre con una sonrisa. Gracias.

A la gente del laboratorio, Ana, Diego, Nacho, Raquel, ... muchas gracias, me acogisteis como una más de vosotros, siempre dispuestos a ayudar y a aconsejar en todo lo que necesitaba.

Finalmente, a mi familia, gracias por estar a mi lado siempre y apoyarme en todo momento. Al final todo pasa. Muchas gracias.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Geles supramoleculares	1
1.1.1. Geles supramoleculares con unidades de ácido succínico	3
1.2. Nanogeles	5
1.2.1. Aplicación biomédica de los nanogeles	5
1.2.2. Nanogeles moleculares	6
2. Objetivos	9
3. Resultados y discusión	11
3.1. Síntesis de SucValTrpPr	11
3.2. Comparación de propiedades físico-químicas de SucValTrpPr y (SucValTpr) ₂ Hx	13
3.2.1. Determinación de propiedades ácido-base (pK_a)	13
3.2.2. Concentración Mínima de Gelación (c.m.g.)	15
3.2.3. TEM	19
3.2.4. Estudio de la formación de nanopartículas mediante DLS	21
3.2.5. Fluorescencia	22
4. Conclusiones	25
5. Sección Experimental	27
5.1. Métodos Generales	27
5.2. Síntesis de SucValTrpPr	28
5.2.1. Síntesis de ZTrpPr	29
5.2.2. Obtención de HTrpPr	30

5.2.3.	Obtención de ZValTrpP	30
5.2.4.	Obtención de HValTrpPr	31
5.2.5.	Obtención del producto final, SucValTrpPr	32
5.3.	Determinación del pK_a	32
5.4.	Preparación de los geles	33
5.4.1.	Método por calentamiento	33
5.4.2.	Método por precipitación	33
5.4.3.	Método por cambio de pH	33
5.5.	TEM	34
5.6.	DLS (<i>dynamic light scattering</i>)	34
5.7.	Preparación de las nanopartículas	34
6.	Anexo	35
6.1.	Espectros RMN	35
6.2.	Correlogramas de los compuestos SucValTrpPr y (SucValTrp) ₂ Hx	45
6.3.	Distribución de tamaño de SucValTrpPr y (SucValTrp) ₂ Hx obtenido por DLS.	46

Introducción

Introducción

1.1. Geles supramoleculares

Los geles supramoleculares son aquellos con bajo peso molecular que se forman mediante la interacción de pequeñas moléculas, generando estructuras fibrilares. A una determinada concentración éstas son capaces de entrecruzarse físicamente, permitiendo retener el disolvente gracias a la tensión superficial y formar los geles.¹ Este tipo de geles, se ha desarrollado en los últimos años, teniendo utilidades en distintos campos, debido a las propiedades específicas que ofrecen (Figura 1.1).²

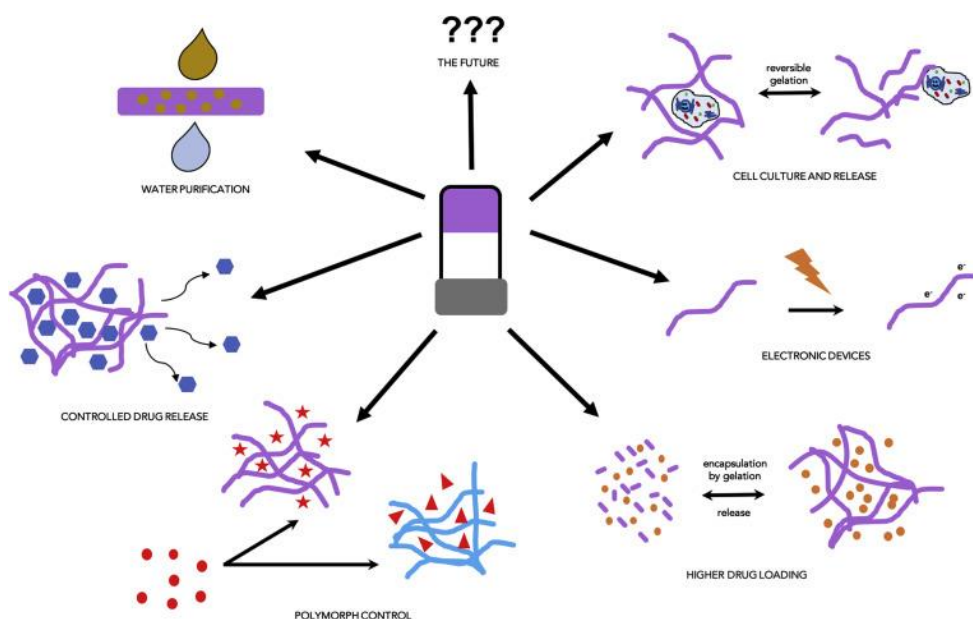


Figura 1.1. Aplicaciones de los geles supramoleculares.

La interacción específica de las moléculas para obtener las fibras y la formación de agregados permite que éstas puedan ser usadas en la optoelectrónica.³ Otra

¹ Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1201-1218.

² Draper, E. R.; Adams, D. J. *Chem. Rev.* **2017**, 3, 390-410.

³ Ghosh, S.; Praveen, V. K.; Ajayaghosh, A. *Annu. Rev. Mater Res.* **2016**, 46, 235-262.

aplicación a destacar a nivel celular es la liberación controlada de fármacos (*drug delivery*) debido a la reversibilidad en la formación del gel.⁴

En cuanto a la formación de los geles, es difícil predecir qué moléculas van a gelificar. Moléculas estructuralmente similares pueden que tengan un comportamiento distinto para formar dichos geles. Existe un gran número de publicaciones basadas en entender este comportamiento.^{5,6} Una de las posibles causas es que en la formación de los geles intervienen muchos factores interrelacionados. Por ejemplo, cambiar únicamente un grupo funcional de la molécula cambia a su vez su volumen, la habilidad para el empaquetamiento, los enlaces de hidrógeno, la solubilidad en determinados disolventes, etc.

A su vez, en general, una molécula no va a formar geles en todos los disolventes, solo lo hará en aquellos donde cumpla las condiciones óptimas. Éstas están basadas en las interacciones que se establecen entre la molécula y el disolvente que tienen que favorecer la formación de los agregados. Además, para que se produzca el gel, hay que estar por encima de la concentración mínima de gelación (c.m.g.). Otro factor determinante para la formación o no de los geles es la temperatura.

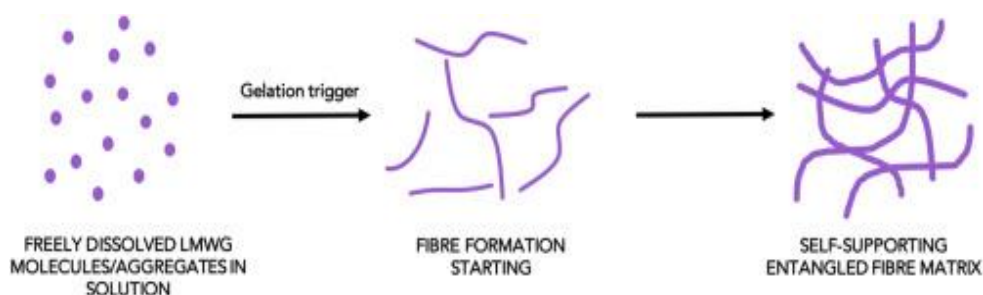


Figura 1.2. Proceso de gelación.

La Figura 1.2 muestra el proceso de gelación. Las moléculas se encuentran inicialmente disueltas. Éstas son sometidas a un proceso desencadenante, y empiezan a interactuar las unas con las otras, para formar las fibras, que finalmente formarán el gel.²

⁴ Skilling, K. J.; Citossi, F.; Bradshaw, T. D.; Ashford, M.; Kellam, B.; Marlow, M. *Soft Matter* **2014**, 10, 237-256.

⁵ Zurcher, D. M.; McNeil, A. J. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 1473-2478.

⁶ Lan, Y.; Corradini, M. G.; Weiss, R. G.; Raghavan, S. R.; Rogers, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6035-6058.

1.1.1. Geles supramoleculares con unidades de ácido succínico

Una posibilidad que ofrecen los geles es introducir unidades de un ácido. En concreto, en trabajos anteriores del grupo en que se ha realizado este trabajo se introdujeron unidades de ácido succínico. La adición de estas unidades permite que la molécula sea sensible al pH del medio en el que se encuentre. Ensayos de biocompatibilidad determinaron la no toxicidad de este tipo moléculas gelificantes.⁷

Algunos de las moléculas estudiadas previamente son las que se muestran en la Figura 1.3. De dichos compuestos, los referenciados como 1, 2 y 3 muestran buena capacidad para formar geles en agua solamente calentando las disoluciones. En contra de esto, el compuesto 4, no es capaz de formar gel debido a su menor carácter hidrofílico.⁸

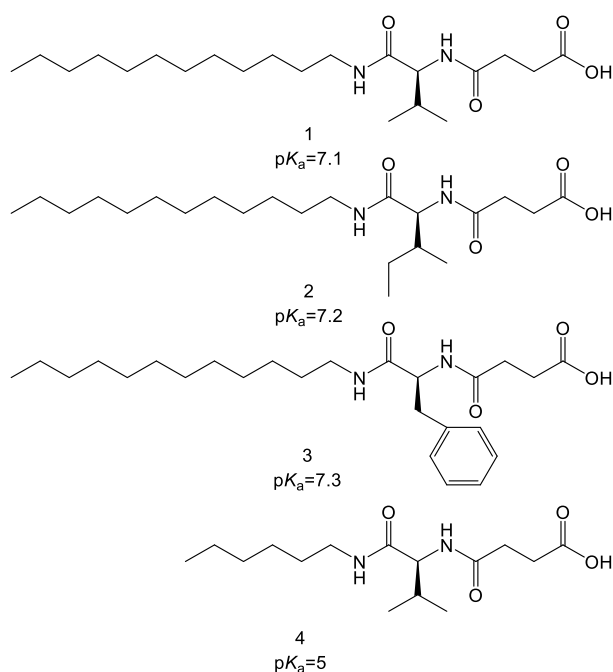


Figura 1.3. Algunas moléculas estudiadas en el grupo.

⁷ Meyer, B. N.; Ferriggni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31-34.

⁸ Angulo-Pachón, C. A.; Miravet, J. F. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5398-5401.

Los compuestos expuestos en la Figura 1.3, son aquellos en los que únicamente se ha añadido una unidad de grupo ácido. Pero, en el grupo de investigación, también se realizan ensayos en moléculas bolaanfílicas como, por ejemplo, el compuesto 6 en la Figura 1.4.⁹

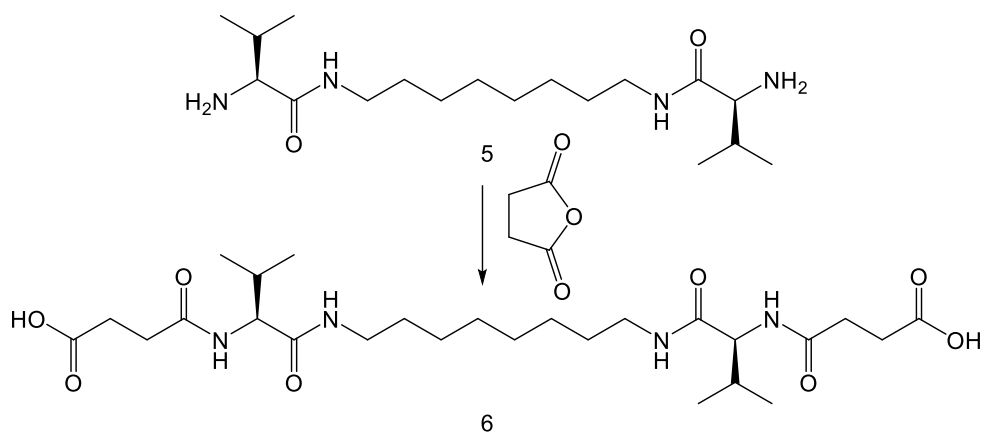


Figura 1.4. Preparación y estructura del gelante bolaanfílico 6.

Las propiedades de gelación del compuesto 6 fueron estudiadas en diferentes disolventes orgánicos y agua, usando el método calentar-enfriar. Se observó que la capacidad de gelación puede estar relacionada con la polaridad del disolvente. El gelante es soluble en etanol (y otros alcoholes) a temperatura ambiente y es insoluble en disolventes no polares. Así, la formación de geles sólo se observó en disolventes como el agua, acetonitrilo, tetrahidrofurano y 1,4-dioxano.⁹ Un modelo de cómo el compuesto 6 puede formar los agregados es el que se muestra en la Figura 1.5. Dicho modelo se construyó mediante modelización molecular mediante cálculos de mecánica molecular.¹⁰

⁹ Fontanillo, M.; Agudo-Pachón, C. A.; Escuder, B.; Miravet, J. F. *J. Colloid Interf. Sci.* **2013**, *412*, 65-71.

¹⁰ Nebot, V. J.; Armengol, J.; Smets, J.; Prieto, S. F.; Escuder, B.; Miravet, J. F. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 4063-4072.

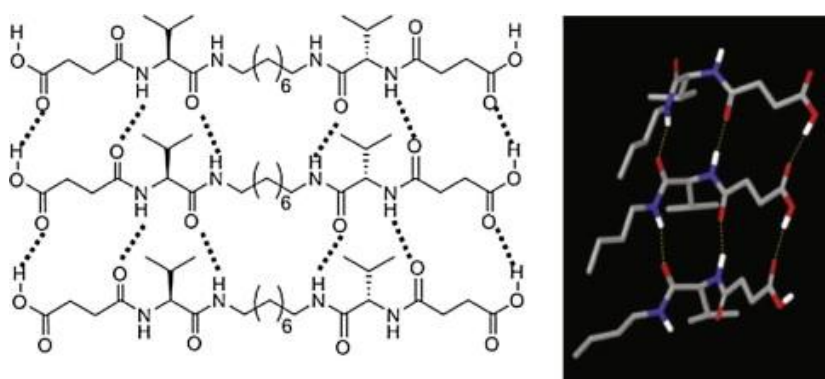


Figura 1.5. Esquema propuesto de agregación del compuesto 6.

1.2. Nanogeles

Nanogeles (o nanohidrogeles) se describen como nanopartículas formadas por una red polimérica capaz de retener una gran cantidad de agua. Estas nanoestructuras han recibido en los últimos años mucha atención debido a sus ventajas frente a otros compuestos nanométricos, como su flexibilidad y su biocompatibilidad.

La mayoría de los nanogeles descritos en la literatura están constituidos por redes de enlaces covalentes, formados, por ejemplo, por emulsiones poliméricas. Aunque también se pueden preparar a partir de precursores poliméricos.¹¹

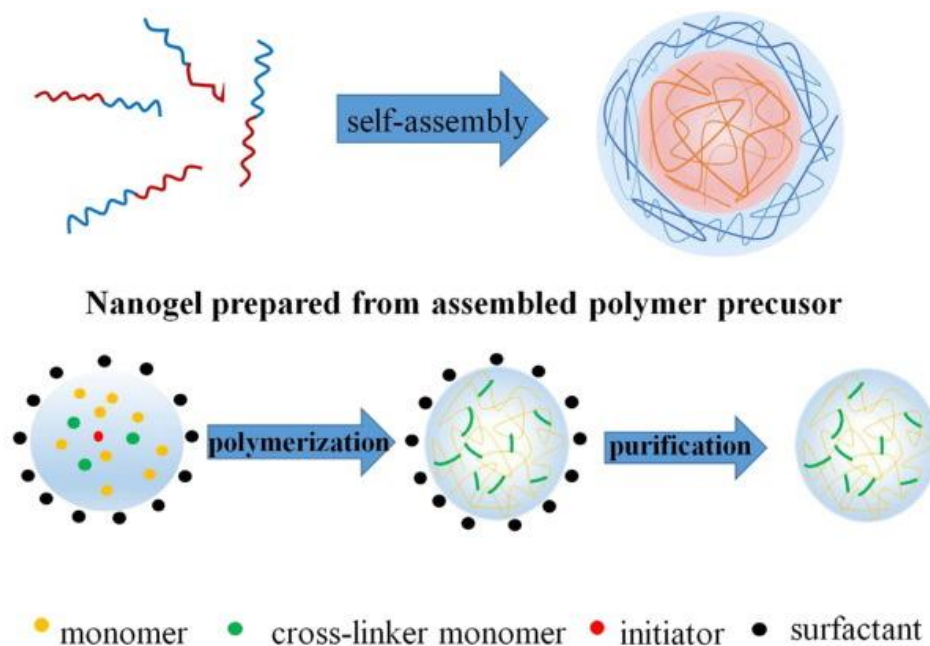
1.2.1. Aplicación biomédica de los nanogeles

Recientemente, la nanotecnología se ha aplicado en el sistema de administración de fármacos, ya que ofrece un método adecuado para la administración de agentes bioactivos específicos del sitio de acción y/o controlados por el tiempo. La nanoescala ofrece a estos sistemas *drug delivery* muchas ventajas. Por ejemplo, mejora la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos, aumenta la acumulación del fármaco en las zonas tumorales, mejora la estabilidad de los agentes terapéuticos frente a la degradación química o enzimática y disminuye los efectos secundarios citotóxicos.¹²

¹¹ Torres-Martínez, A.; Angulo-Pachón, C. A.; Galindo, F.; Miravet, J. F. *Soft Matter* **2019**, 15, 3565-3572.

¹² Qiu, L.; Qiao, M.; Chen, Q.; Tian, C.; Long, M.; Wang, M.; Li, Z.; Hu, W.; Li, G.; Cheng, L.; Cheng, L.; Hu, H.; Zhao, X; Chen, D. *Biomaterials* **2014**, 35, 9877-9887.

Como se ha comentado anteriormente, los nanogeles se pueden obtener a partir de un precursor polimérico o debido al *self-assembly*. (Figura 1.6).¹³



Nanogel synthesized via heterogeneous polymerization of monomers

Figura 1.6. Métodos para la preparación de nanogeles.

1.2.2. Nanogeles moleculares.

Los nanogeles descritos en la literatura son en su totalidad poliméricos excepto por el caso reciente descrito del grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo (Figura 1.7).¹¹ A diferencia de los nanogeles poliméricos, la formación de las fibras en nanogeles moleculares es reversible. Los nanogeles moleculares podrían contribuir a resolver algunos de los problemas asociados con los nanogeles poliméricos como, por ejemplo, la biodegradabilidad del propio polímero o la polidispersidad intrínseca a los polímeros, que dificulta la reproducibilidad en su preparación.

¹³ Zhang, H.; Zhai, Y.; Wang, J.; Zhai, G. *Mater. Sci. Eng.* **2015**, 60, 560-568.

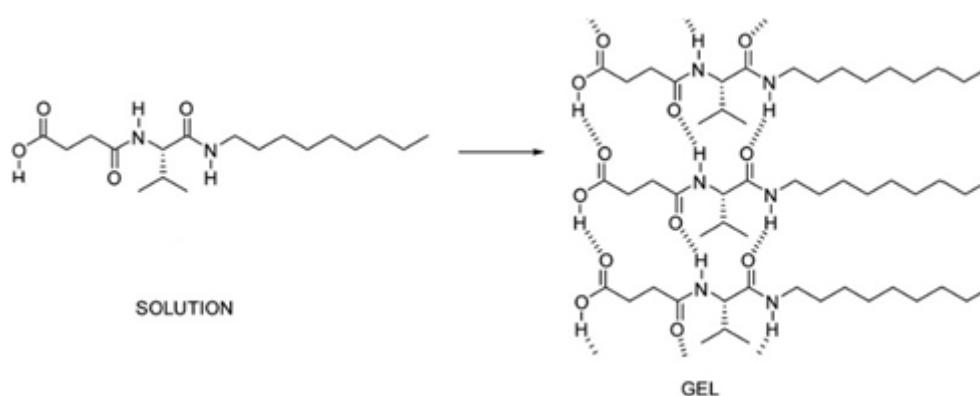


Figura 1.7. Estructura del compuesto utilizado para preparar nanogeles moleculares y un modelo propuesto de agregación.

La formación de nanogeles moleculares a partir del compuesto de la Figura 1.7 se consiguió mediante sonicación de un xerogel en medio acuoso. Los estudios de DLS mostraron la obtención de partículas de tamaño nanométrico (Figura 1.8).

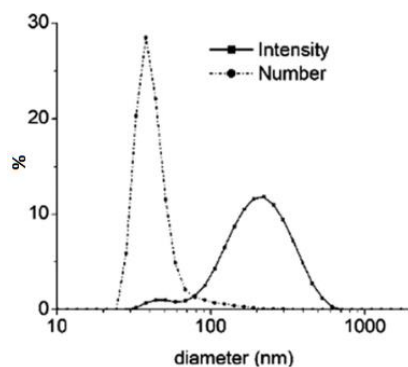


Figura 1.8. Resultados del estudio de DLS para el compuesto 1.

El trabajo que aquí se presenta se basa en el estudio de dos compuestos relacionados con el anterior y está pensado para sentar las bases para su posterior empleo en la generación de nanogeles.

Objetivos

Objetivos

- Síntesis y caracterización del derivado de valina y triptófano SucValTrpPr.

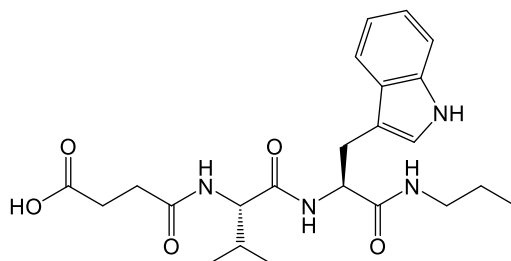


Figura 2.1. Estructura de SucValTrpPr.

- Estudiar la agregación de la molécula SucValTrpPr mediante las técnicas de fluorescencia y DLS (*Dynamic Light Scattering*)
- Comparar los resultados obtenidos con los de la molécula (SucValTrp)₂Hx, preparada anteriormente en el grupo de investigación. De esta manera se pretende evaluar la importancia del carácter bolaanfílico de (SucValTrp)₂Hx en su agregación.

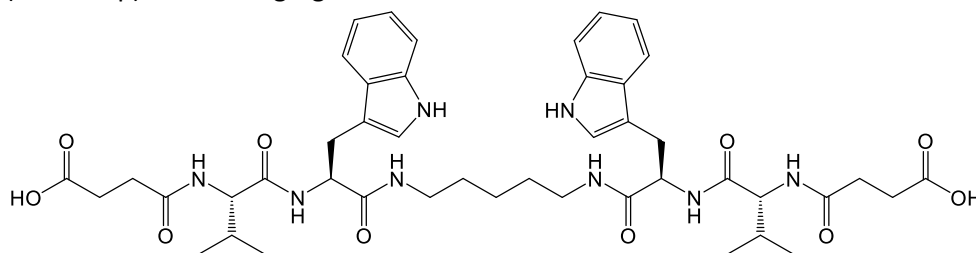
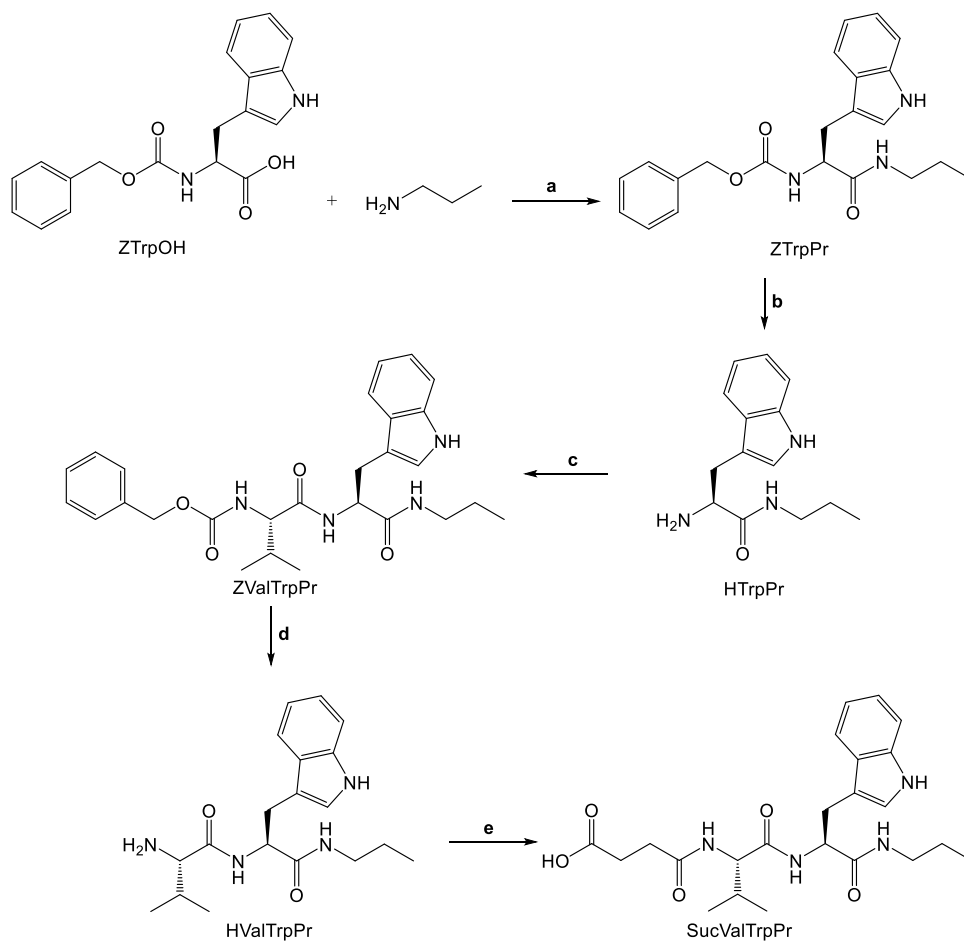


Figura 2.2. Estructura de (SucValTrp)₂Hx

Resultados y Discusión

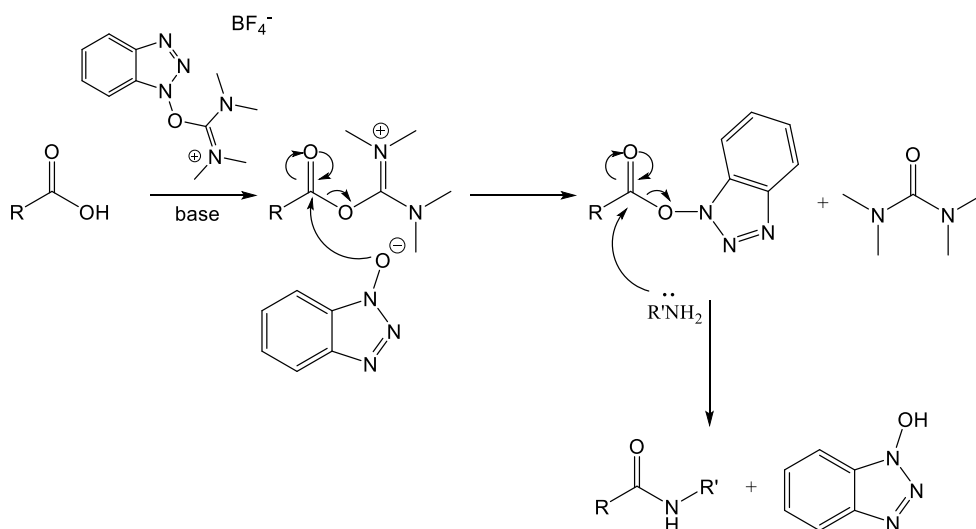
Resultados y Discusión

3.1 Síntesis de SucValTrpPr



Esquema 3.1. Reactivos y condiciones: a) TBTU, DIPEA, CHCl₃, 24h, 50-60%; b) H₂, Pd/C, 4h, 90%; c) ZValOSu, THF, 55°C, 24h, 80%; d) H₂, Pd/C, 4h, 90%; e) Anhídrido succínico, Na₂CO₃, 24h, 85%.

La síntesis descrita en el Esquema 3.1 está basada en la metodología para preparar moléculas relacionadas que viene utilizándose en el grupo. Como se puede observar, la primera reacción es el acoplamiento de la propilamina con el triptófano mediante la activación con el TBTU (véase el mecanismo en el Esquema 3.2). El segundo paso es la desprotección del grupo carbobenciloxi (grupo Z), para un segundo acoplamiento con el éster activado de L-valina. El cuarto paso es otra desprotección y finalmente, el último paso de la síntesis es el acoplamiento con el anhídrido succínico para dar el producto final (SucValTrpPr).



Esquema 3.2. Mecanismo de formación de enlace amida promovido por TBTU.

3.2 Comparación de propiedades físico-químicas de SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx

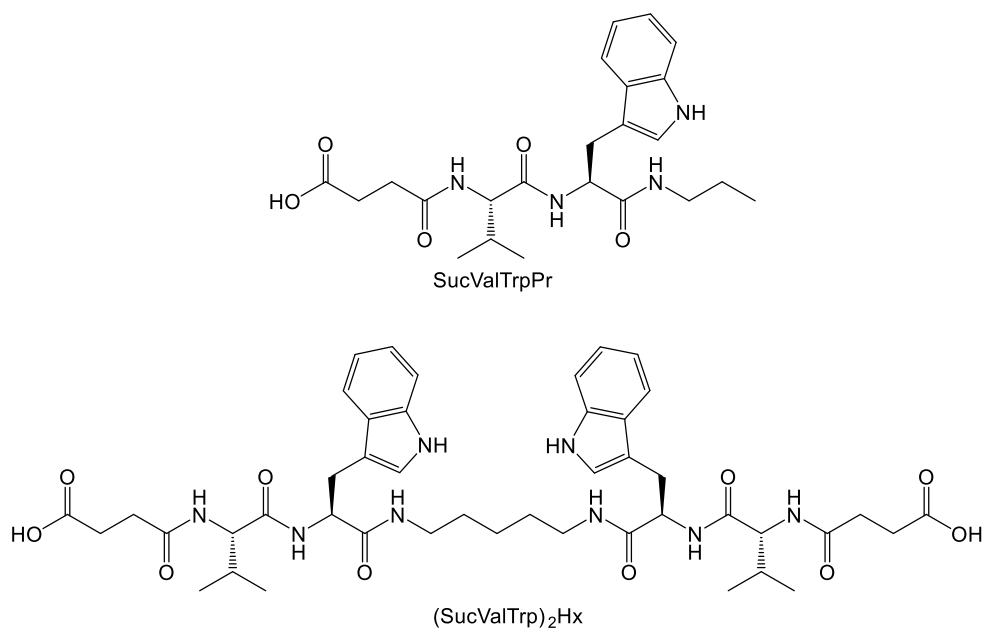


Figura 3.1. Estructuras del SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx

3.2.1. Determinación de propiedades ácido-base (pK_a)

Se realizó una valoración potenciométrica para la determinación de las constantes de acidez de ambos compuestos. Las constantes se obtuvieron mediante ajuste iterativo de los datos experimentales con los teóricos con el programa HYPERQUAD tal y como se muestra como ejemplo para el caso de (SucValTrp)₂Hx en la Figura 3.2. Los valores obtenidos de pK_a se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3.1. Valores obtenidos de pK_a

Compuesto	pK_{a1}	pK_{a2}
SucValTrpPr	4.6	-
(SucValTrp) ₂ Hx	5.2	5.8

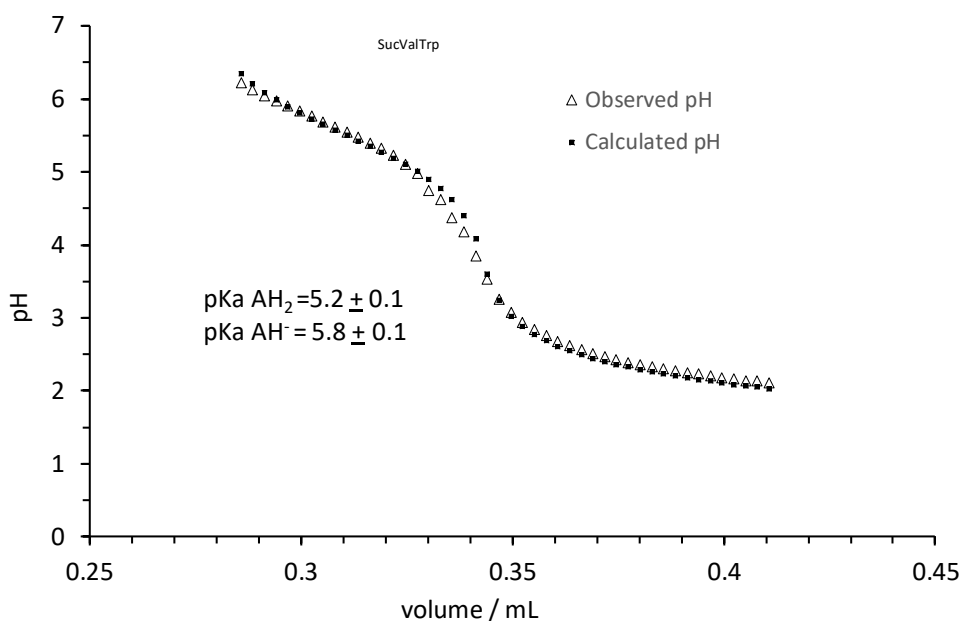


Figura 3.2. Valoración potenciométrica del (SucValTrp)₂Hx.

Con dichos valores de pK_a se construyeron con el programa Hyss2009 los diagramas de distribución de especies que se pueden ver en la Figura 3.3.

Como se puede observar en la Figura 3.3, en el caso de SucValTrpPr, por debajo de su pK_a (4.6) predomina la especie neutra protonada y por encima predomina la especie desprotonada monoaniónica que, a priori, debe presentar una mayor solubilidad en agua dado su carácter iónico.

Por otra parte, el compuesto (SucValTrp)₂Hx es diprótico. Por debajo de pH 5.2 predomina la especie doblemente protonada, neutra. Por encima de pH 5.8 es mayoritaria la especie completamente desprotonada, dianiónica. Finalmente, entre pH 5.2 y 5.8 se obtiene una mezcla de las tres posibles especies, siendo la monoaniónica siempre minoritaria.

La diferencia del valor de los pK_a para la primera desprotonación de (SucValTrp)₂Hx y la de SucValTrpPr, 5.2 y 4.6 respectivamente, probablemente se debe a que en el caso de (SucValTrp)₂Hx, éste es un compuesto con una alta tendencia a la agregación en su forma neutra, haciendo que su desprotonación no sea tan favorable y, por tanto, aumente dicho valor.

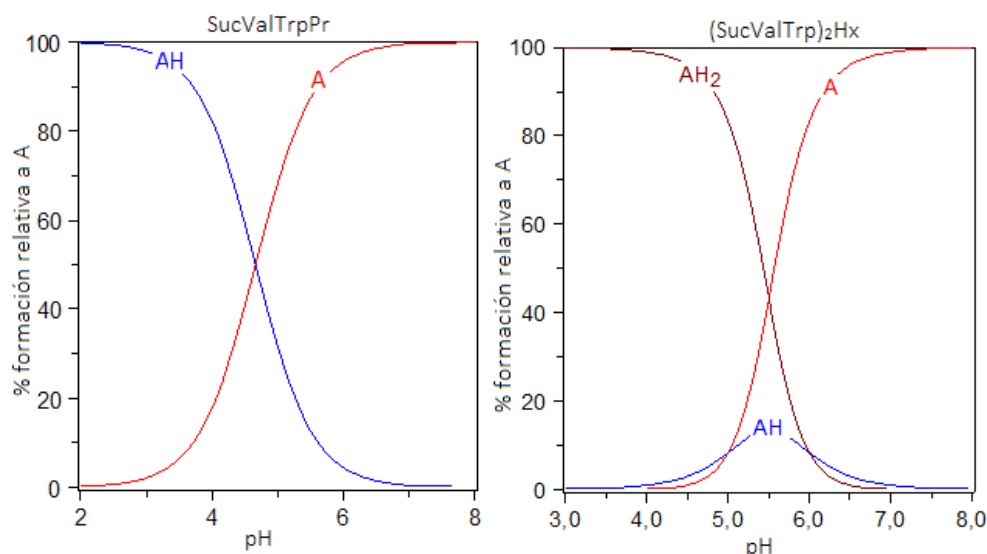


Figura 3.3. Diagrama de distribución de especies de los compuestos SucValTrpPr y $(\text{SucValTrp})_2\text{Hx}$.

3.2.2. Concentración Mínima de Gelación (c.m.g.)

Para determinar la concentración mínima de gelación se realizaron en primer lugar estudios en disolventes orgánicos por el método de calentamiento hasta disolución y posterior enfriamiento (método calentar-enfriar). Cuando la disolución caliente se enfría las moléculas disueltas empiezan a agregar y se pueden dar tres situaciones, que se produzca una agregación aleatoria, que se produzca una agregación ordenada formando cristales o que se produzca una agregación mixta de los dos procesos anteriores y que se produzca el gel. Al enfriarse por debajo de la temperatura de transición disolución-gel las moléculas interaccionan conduciendo a la formación de las fibras, y finalmente a la formación de los geles.¹⁴ Con este método, utilizando SucValTrpPr se consiguió gelificar tolueno, cloroformo y diclorometano y con $(\text{SucValTrp})_2\text{Hx}$ solamente acetonitrilo. En algunos casos fue necesario sonicar las muestras para conseguir la formación de geles. Los resultados se recogen en la Tabla 3.2.

También se estudió el valor de c.m.g. usando como disolvente el agua por dos métodos diferentes. En el primero se adiciona una disolución en DMSO del gelante sobre agua alcanzando una proporción final DMSO:agua de 1:9. De este modo, el

¹⁴ Pang, Z.; Wei, Y.; Wang, N.; Zhang, J.; Gao, Y.; Qian, S. *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 625-635.

soluto disuelto en el disolvente orgánico difundirá al agua causando la separación de la fase y la formación del gel.

Un método alternativo consiste en acificar el pH de una disolución básica del gelante. Esta acidificación se realizó mediante el uso de D-glucono- δ -lactona, cuya hidrólisis progresiva en agua genera ácido glucónico, reduciendo el pH (Figura 3.4) y formando el gel. Los resultados se recogen en la Tabla 3.2.

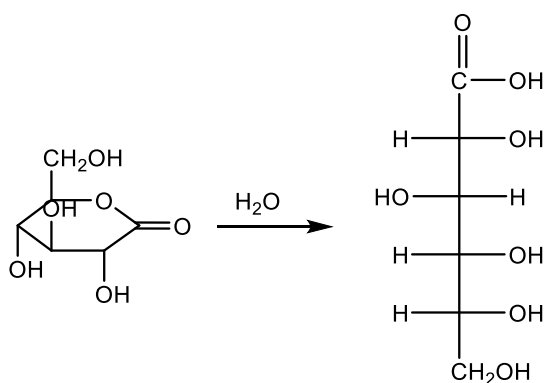


Figura 3.4. Hidrólisis de gluconolactona.

Tabla 3.2. Concentración mínima de gelación mg/mL

Disolvente	SucValTrpPr		(SucValTrp) ₂ Hx	
	Apariencia	cmg	Apariencia	cmg
Tolueno	Gel	3*	Insoluble, agregados gelatinosos	-
CH ₃ CN	Soluble	-	Gel	2*
CHCl ₃	Gel	3.5	Insoluble, agregados gelatinosos	-
CH ₂ Cl ₂	Gel	2	Insoluble, agregados gelatinosos	-
H ₂ O:DMSO (9:1)	Gel	18	Gel	4
H ₂ O cambio de pH	Gel	15	Gel	4

* Requiere sonicación

La comparación de los datos de la tabla indica que el paso de una estructura anfifílica a una bolaanfifílica tiene efectos importantes en las propiedades de gelación. En el caso de $(\text{SucValTrp})_2\text{Hx}$ solamente es capaz de formar geles en un disolvente orgánico de los estudiados, acetonitrilo, el más polar. La posibilidad de formación de múltiples enlaces de hidrógeno intermoleculares hace que su disolución en disolventes orgánicos de polaridad moderada no sea factible. Por el contrario, SucValTrpPr , que formalmente es una molécula mitad de la anterior, es capaz de formar en todos los disolventes orgánicos estudiados excepto en acetonitrilo. La mayor polaridad de este disolvente hace que la molécula sea soluble en el mismo.

Por otro lado, la concentración mínima de gelación en medios acuosos es sensible inferior en el caso del compuesto bolaanfifílico. La presencia de dos unidades aromáticas extendidas de Trp en $(\text{SucValTrp})_2\text{Hx}$ favorece su agregación en agua, debido probablemente a las de interacciones intermoleculares $\pi-\pi$ y de carácter hidrofóbico.

En las siguientes imágenes se presentan fotos de los diferentes geles formados.

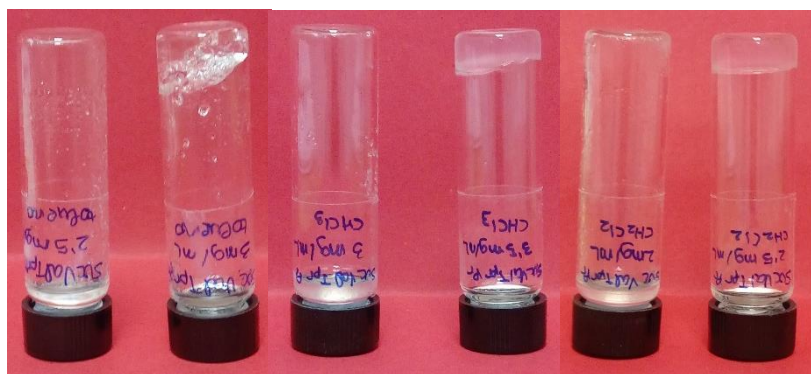


Figura 3.5. Geles de SucValTrpPr con tolueno, cloroformo y diclorometano (de izquierda a derecha).

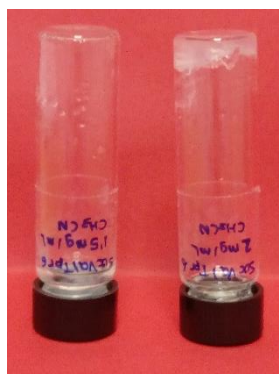


Figura 3.6. Gel (SucValTrp)₂Hx en acetonitrilo.

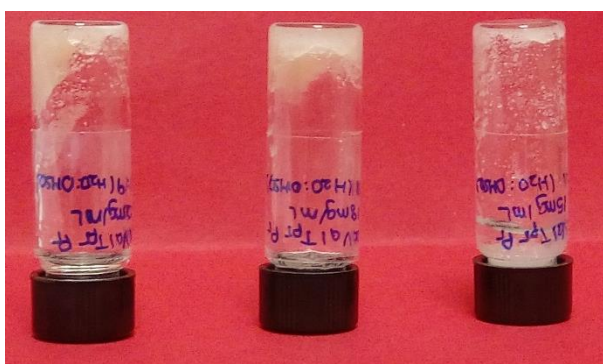


Figura 3.7. Gel SucValTrpPr en H₂O:DMSO a diferentes concentraciones (de izquierda a derecha; 20mg/mL, 18mg/mL y 15mg/mL).



Figura 3.8. Gel (SucValTrp)₂Hx en H₂O:DMSO a diferentes concentraciones (de izquierda a derecha; 7mg/mL, 5mg/mL, 4mg/mL y 3mg/mL).



Figura 3.9. Gel SucValTrpPr en gluconolactona a diferentes concentraciones (izquierda, 13mg/mL y derecha 15mg/mL).



Figura 3.10. Gel (SucValTrp)₂Hx en gluconolactona a diferentes concentraciones (izquierda, 3mg/mL y derecha 4mg/mL).

3.2.3. TEM

Con la finalidad de observar la morfología de las redes fibrilares, se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los geles tras eliminar el disolvente, es decir, de xerogeles. Para realizar un estudio comparativo, se eligieron los geles formados en agua (con gluconolactona, Figura 3.11) y con algunos de los disolventes orgánicos (Figura 3.12). En general se observó la formación de fibras entrelazadas, aspecto común en xerogeles moleculares. Cabe destacar la presencia de fibras helicoidales que expresan la quiralidad de la molécula en el caso del gel formado por SucValTrpPr en cloroformo.

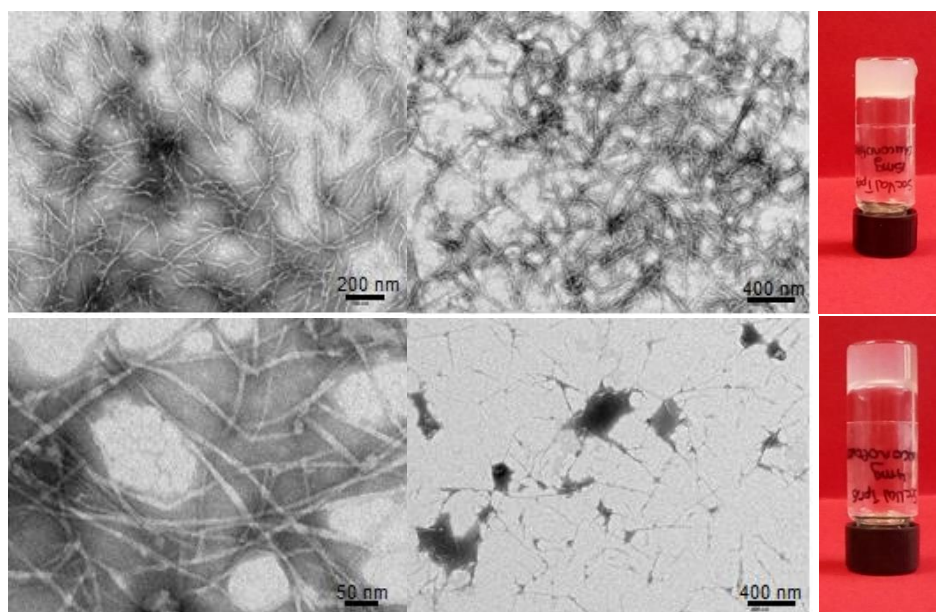


Figura 3.11. Imágenes TEM de SucValTrpPr (arriba, 15mg/mL) y de (SucValTrp)₂Hx (abajo, 4mg/mL) con gluconolactona.

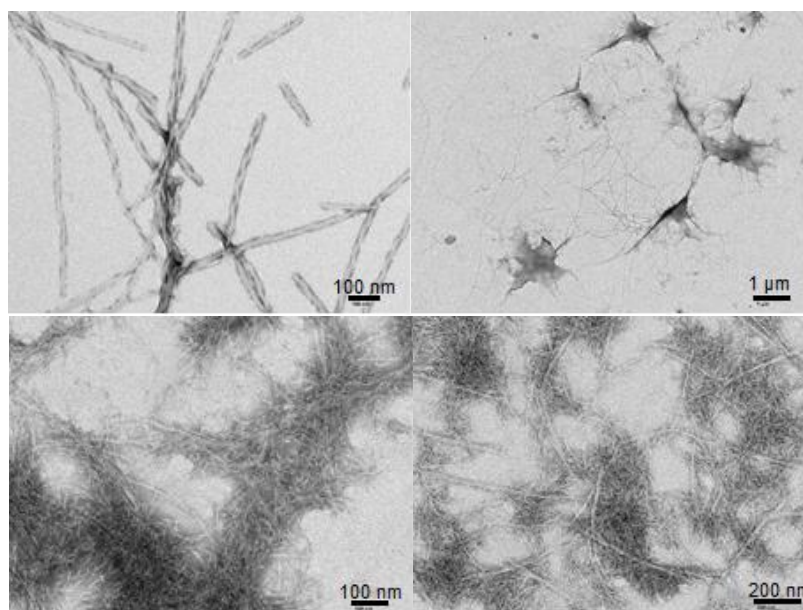


Figura 3.12. Imágenes TEM de SucValTrpPr con cloroformo (arriba, 5.5mg/mL) y del SucValTrp6 con acetonitrilo (abajo, 4mg/mL).

3.2.4. Estudio de la formación de nanopartículas mediante DLS.

Siguiendo los resultados recientes en el grupo de investigación, se valoró la formación de nanopartículas por las moléculas estudiadas en su forma iónica, a pH 7.4 en presencia de tampón fosfato 0.2 M. Aunque a priori parece que el carácter iónico de las moléculas a este pH evitaría su agregación, diferentes estudios previos demostraron la existencia de nanopartículas que tendrían, en principio, un carácter micelar o vesicular.

Se disolvieron los compuestos SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx en el mencionado tampón a pH 7.4 alcanzando una concentración de 3mM. Las disoluciones ópticamente transparentes obtenidas se analizaron mediante DLS. En el caso del compuesto SucValTrpPr se obtuvo un correlograma irregular indicativo de la ausencia de objetos nanoscópicos (Figura 3.13, izquierda). Por el contrario, en el caso del compuesto (SucValTrp)₂Hx se obtuvo un buen correlograma (Figura 3.13, derecha).

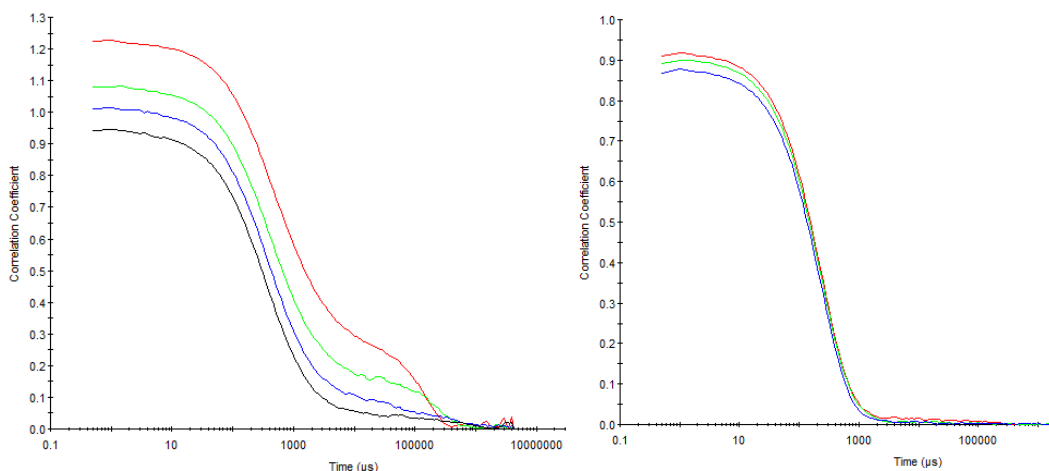


Figura 3.13. Correlograma del SucValTrpPr a pH 7.4 3 mM (izquierda) y del (SucValTrp)₂Hx a pH 7.4 2 mM (derecha).

La transformación de los datos del correlograma en valores de tamaño de partícula reveló una distribución monomodal con un diámetro promedio, calculado en base a la intensidad de luz dispersada, de 177 ± 77 nm (Figura 3.14).

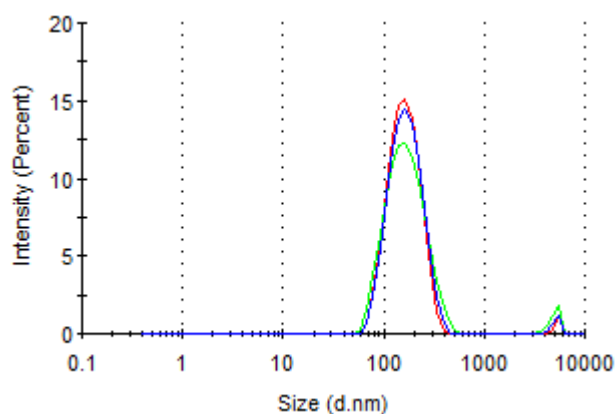


Figura 3.14. Distribución del tamaño de partícula obtenido por DLS.

3.2.5. Fluorescencia

Dadas las propiedades fluorescentes del triptófano, se realizó estudio comparativo de la fluorescencia de las dos moléculas y su posible uso como indicador de agregación molecular. El triptófano contiene un anillo de indol que presenta propiedades fluorescentes ampliamente estudiadas en el contexto del estudio de proteínas.

Se estudió la influencia de la concentración en la intensidad de emisión a 349 nm de SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx a pH 7.4 (Figura 3.15). Puede observarse una caída acusada de la intensidad de fluorescencia con la concentración en ambos casos. Teniendo en cuenta que el compuesto SucValTrpPr no forma agregados a las concentraciones estudiadas, dicha caída debe asignarse al decaimiento no radiactivo de los estados excitados (“*quenching*”) por choques intermoleculares. Por lo tanto, no puede concluirse que la variación de fluorescencia con la concentración observada para (SucValTrp)₂Hx esté asociada al proceso de agregación.

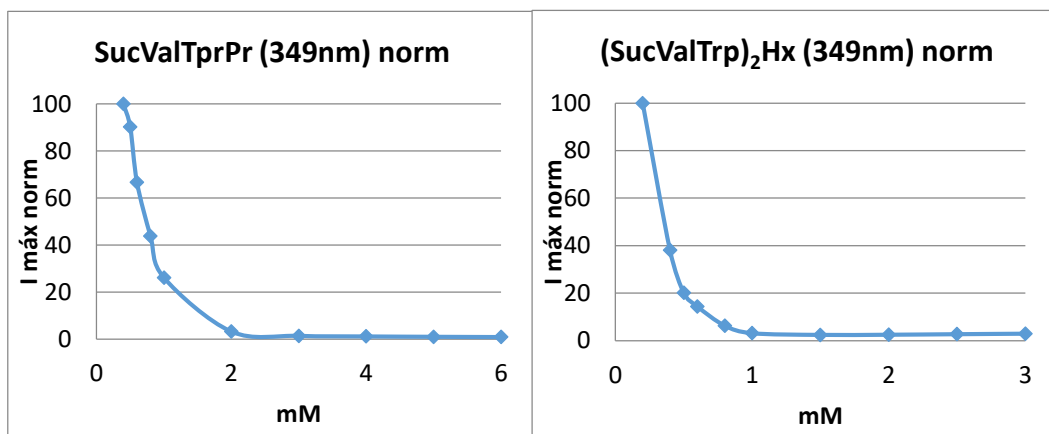


Figura 3.15. Fluorescencia del SucValTrpPr (izquierda) y del (SucValTrp)₂Hx (derecha) a distintas concentraciones.

También se estudió la variación de la intensidad de fluorescencia con el pH (Figura 3.16). Para SucValTrpPr se observa un aumento notable de la intensidad con el pH que estaría asociada la desprotonación progresiva del ácido, que, según el diagrama de distribución de especies anteriormente citado existe en disolución hasta pH 7. Parece, por lo tanto, que la forma iónica de esta molécula presenta una mayor fluorescencia que la neutra, probablemente debido al notable cambio en la solvatación de ambas especies. En el caso de (SucValTrp)₂Hx, curiosamente el fenómeno observado es el contrario, disminuyendo la intensidad de fluorescencia con el pH al pasar de las especies neutras y monoaniónicas a los dianiónicas. Hay que tener en cuenta que, a las concentraciones estudiadas, este compuesto presenta capacidad de agregación y por ello dichos cambios pueden estar relacionados con los diferentes grados de agregación presentes al variar el pH.

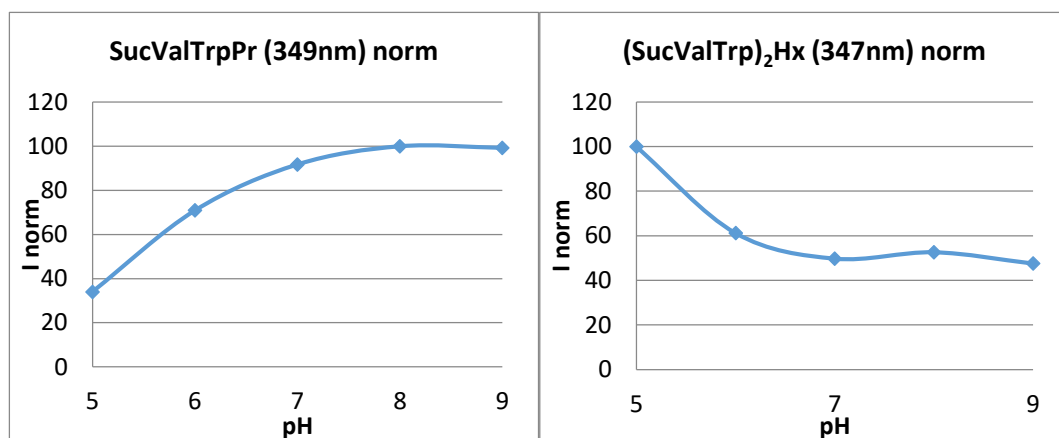


Figura 3.16. Fluorescencia de los compuestos SucValTrpPr 1 mM (izquierda) y (SucValTrp)₂Hx 0.5 mM (derecha) a diferentes valores de pH.

Conclusiones

Conclusiones

- Se ha preparado y caracterizado SucValTrpPr con un rendimiento global de 30%.
- Se han determinado el valor del pK_a para los dos compuestos estudiados en este trabajo. Se observa que para valores de pH superiores a 5 predominan las especies iónicas en disolución.
- La capacidad de formación de geles en disolventes orgánicos para SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx difiere notablemente. El compuesto anfifílico gelifica en varios disolventes (cloroformo, diclorometano y tolueno), mientras que el bolanfílico únicamente lo hace con el acetonitrilo, el de mayor polaridad estudiada.
- La concentración mínima de gelación en agua para SucValTrpPr es superior que la de (SucValTrp)₂Hx. Por lo tanto, la estructura bolaanfílica resulta tener una mejor eficiencia de hidrogelación.
- Se han obtenido imágenes de TEM de las redes fibrilares de diferentes xerogeles. En el caso del gel formado por SucValTrpPr en cloroformo, se observan fibras helicoidales.
- Se ha estudiado la posible formación de nanopartículas iónicas a pH 7.4. Se observa que solamente la estructura bolaanfílica forma objetos nanométricos que, de acuerdo con los estudios de DLS, presentan un diámetro promedio, según la intensidad de luz dispersada de 177 nm.
- Los estudios de fluorescencia, asociada a la presencia de una unidad de indol, revelan que al aumentar la concentración ocurre una disminución de la intensidad de emisión asociada probablemente a *quenching* por colisiones intermoleculares.
- Los estudios de fluorescencia de SucValTrpPr por cambio de pH muestran un aumento de la intensidad de emisión al basificar en el rango de pH 5-8. Dicho cambio se asocia a la ionización de dicha molécula.
- La fluorescencia de (SucValTrp)₂Hx al aumentar el pH en el rango de 5-8 resulta en una disminución de la intensidad de emisión que podría asociarse a la distinta naturaleza de los agregados presentes, resultado del diferente grado de ionización.

Sección Experimental

Sección Experimental

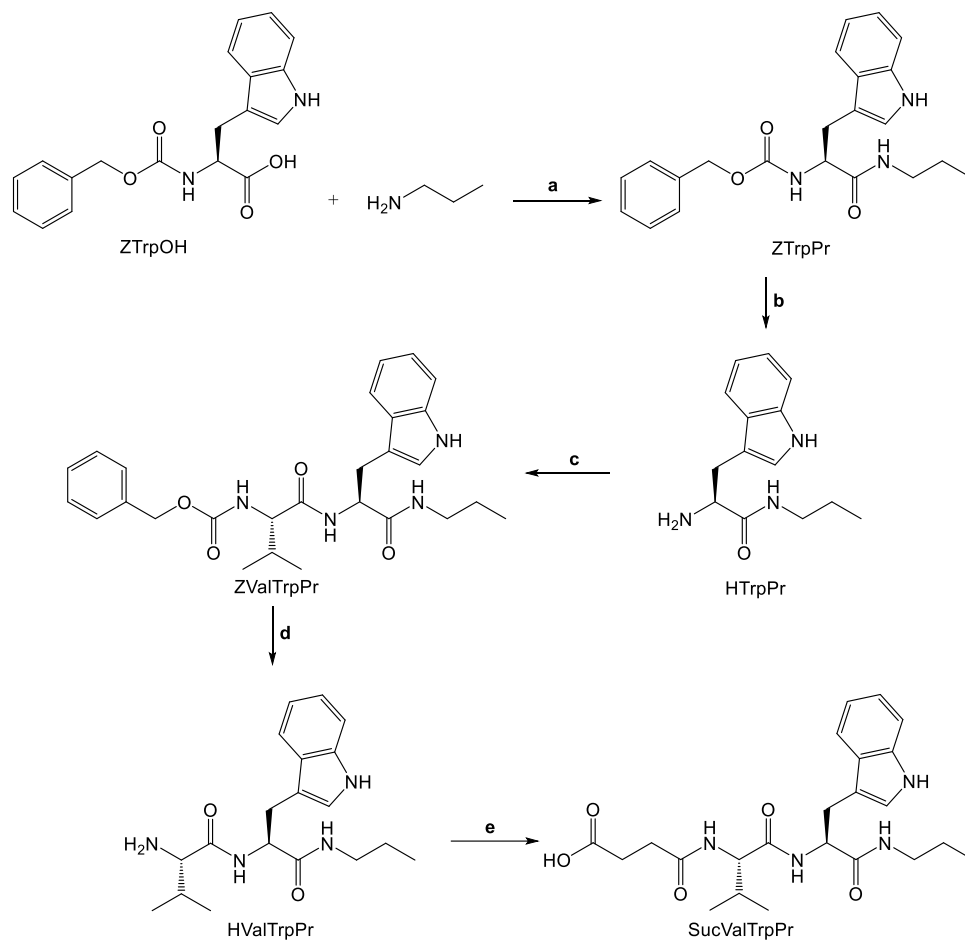
5.1 Métodos Generales

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C fueron realizados con un espectrómetro Bruker Avance III HD 400 MHz y con un espectrómetro Agilent INOVA System 500 MHz, usando como disolvente dimetilsulfóxido a una temperatura de 30°C. Las señales del disolvente deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) que se toman como referencia son, el singulete de 2.50 ppm y el cuádruplete que aparece a 39.52 ppm, de los espectros de ^1H y ^{13}C , respectivamente. Las señales fueron asignadas con la ayuda de métodos 2D (COSY y HSQC).

El espectro de masas fue realizado por *Mass Spectrometry triple Quadrupole Q-TOF Premier* con Electrospray y APCI acoplados (ESMS).

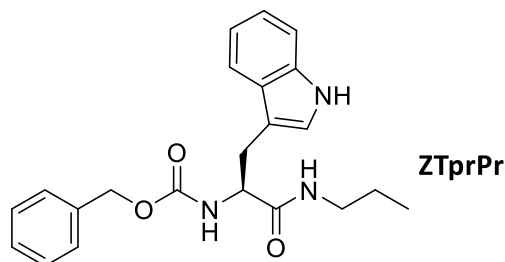
Las reacciones que necesitaban atmósfera inerte fueron llevadas a cabo bajo una atmósfera de N_2 . Los reactivos disponibles comercialmente fueron utilizados tal y como fueron recibidos.

5.2 Síntesis de SucValTrpPr



Esquema 5.1. Reactivos y condiciones: a) TBTU, DIPEA, CHCl_3 , 24h, 50-60%; b) H_2 , Pd/C, 4h, 90%; c) ZValOSu, THF, 55°C, 24h, 80%; d) H_2 , Pd/C, 4h, 90%; e) Anhídrido succínico, Na_2CO_3 , 24h, 85%.

5.2.1. Síntesis ZTprPr



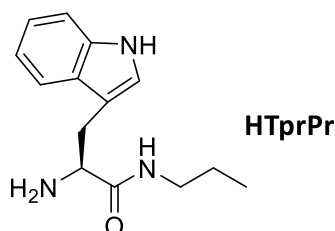
A una disolución del aminoácido comercial ZTprOH (3.0 g, 8.87 mmol) en cloroformo (120 mL) se le añadió secuencialmente TBTU (3.13, 7.75 mmol, 1.1 eq.), *n*-propilamina (730 μ L, 8.87 mmol, 1.0 eq.) y la *N*, *N*-diisopropiletilamina (1600 μ L, 9.75 mmol, 1.1 eq.) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo el disolvente se eliminó a vacío y el crudo obtenido fue lavado con NaOH 1 M y HCl 1 M. Finalmente se hicieron lavados con agua destilada hasta pH 7. Obteniéndose un sólido amarillo, el cual fue secado en estufa de vacío a 55°C. Rendimiento: 3.83 g, 50%.

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 7.91 (t, 1H, $J=5$ Hz), 7.60 (d, 1H, $J=10$ Hz), 7.36 – 7.22 (m, 6H), 7.13 (s, 1H), 7.06 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 6.97 (t, 1H, $J=7.5$ Hz), 4.95 (s, 2H), 4.24 (s, 1H), 3.08 (dd, 1H, $J=9.5$ Hz), 3.01 (m, 2H), 2.92 (dd, 1H, $J=4.75$ Hz), 1.36 (s, 2H), 0.79 (t, 3H, $J=7.5$ Hz).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 171.5 (C=O), 155.7 (C=O), 137.0 (C_{arom}), 136.0 (C_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 127.6 (CH_{arom}), 127.4 (CH_{arom}), 127.3 (C_{arom}), 123.7 (CH_{arom}), 120.8 (CH_{arom}), 118.5 (CH_{arom}), 118.1 (CH_{arom}), 111.2 (CH_{arom}), 110.2 (C_{arom}), 65.2 (CH_2), 55.6 (CH), 40.3 (CH_2), 28.0 (CH_2), 22.2 (CH_2), 11.2 (CH_3).

HR ESMS: m/z : calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$: 379.19; found: 441.3089 [$\text{M} + \text{Na}^+$].

5.2.2. Obtención de HTprPr

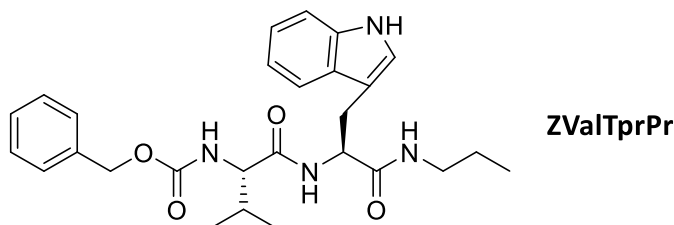


El catalizador de Pd/C (160 mg, 10% en peso) fue suspendido en MeOH (15 mL) y agitado bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente. Seguidamente, una disolución de ZTprPr (1.60 g, 4.21 mmol) en MeOH (10 mL) fue añadida por medio de una jeringa. La mezcla resultante se dejó agitando durante cuatro horas bajo atmósfera de hidrógeno y a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró a vacío a través de una capa de Celite®, y el solvente fue eliminado a vacío, obteniéndose un sólido blanco. Rendimiento: 0.941 g, 91%.

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.81 (s, 1H), 7.79 (t, 1H, *J*=4 Hz), 7.54 (d, 1H, *J*=8 Hz), 7.34 (d, 1H, *J*=8 Hz), 7.13 (s, 1H), 7.05 (t, 1H, *J*=8 Hz), 6.96 (t, 1H, *J*=8 Hz), 3.41 (m, 1H), 3.31 (s, 2H), 3.07 (d, 1H, *J*=4 Hz), 3.01 (m, 2H), 2.73 (dd, 1H, *J*=8 Hz), 1.34 (s, 2H), 0.78 (t, 3H, *J*=8 Hz).

¹³C RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 174.4 (C=O), 136.2 (C_{arom}), 127.4 (C_{arom}), 123.7 (CH_{arom}), 120.8 (CH_{arom}), 118.5 (CH_{arom}), 118.1 (CH_{arom}), 111.2 (CH_{arom}), 110.7 (C_{arom}), 55.4 (CH), 40.1 (CH₂), 31.2 (CH₂), 22.3 (CH₂), 11.3 (CH₃).

5.2.3. Obtención de ZValTrpPr



Una disolución de la amina (HTprPr) (890 mg, 3.628 mmol) en THF (20 mL) en atmósfera de nitrógeno y a temperatura ambiente se le añadió gota a gota con un embudo de adición compensada una disolución de ZValOSu (sintetizado previamente en el laboratorio) (1.26 g, 3.63 mmol, 1.0 eq.) en THF (10 mL). La mezcla obtenida se dejó agitando toda la noche en atmósfera de nitrógeno a 55°C. Seguidamente el disolvente fue eliminado a vacío y el sólido obtenido se lavó

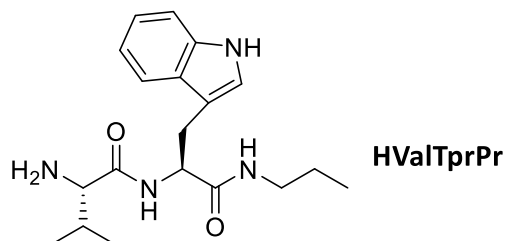
primero con agua básica y luego con agua ácida. Finalmente se realizó un último lavado con agua destilada obteniéndose un sólido amarillo el cual se dejó secando en estufa de vacío durante 16 horas a 50°C. Rendimiento: 1.42g, 82%.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.77 (s, 1H), 7.91 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 7.80 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz), 7.57 (s, 1H), 7.42 – 7.19 (m, 8H), 7.11 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.53 (s, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.06 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz), 2.94 (d, 1H), 2.33 (s, 1H), 1.91 (s, 1H), 1.29 (s, 2H), 0.76 (s, 6H), 0.73 (d, 3H, $J = 7.4$ Hz).

RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6): δ 170.9 (C=O), 170.7 (C=O), 156.1 (C=O), 137.0 (C_{arom}), 136.0 (C_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 127.7 (CH_{arom}), 127.6 (CH_{arom}), 127.3 (C_{arom}), 123.4 (CH_{arom}), 120.7 (CH_{arom}), 118.1 (CH_{arom}), 118.4 (CH_{arom}), 111.1 (CH_{arom}), 109.9 (C_{arom}), 65.4 (CH_2), 60.3 (CH), 53.3 (CH), 40.3 (CH_2), 30.3 (CH), 28.0 (CH_2), 22.0 (CH_2), 19.0 (CH_3), 18.0 (CH_3), 11.2 (CH_3).

HR ESMS: m/z : calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$: 478.26; found: 441.3089 [$\text{M} + \text{Na}^+$].

5.2.4. Obtención de HValTrpPr



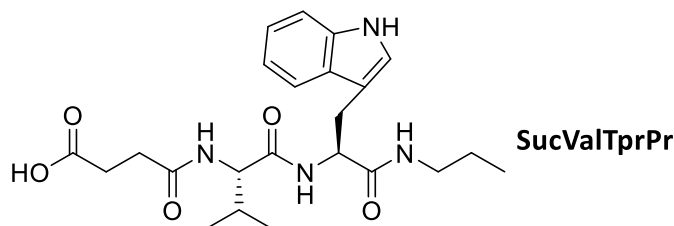
La hidrogenación del ZValTrpPr fue llevado a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el de la hidrogenación del ZTrpPr.

142 mg de Pd/C, 1.42 g de ZValTrpPr y 16 mL de MeOH. Rendimiento: 827 mg, 83%.

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10.77 (s, 1H), 7.98 (d, 1H, $J=7.7$ Hz), 7.84 (t, 1H, $J=4$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.09 (s, 1H), 7.04 (t, 1H, $J=7.2$ Hz), 6.96 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 4.54 (m, 1H), 3.07-2.95 (m, 4H), 1.86 (m, 1H), 1.33 (m, 2H), 0.77 (d, 3H, $J=6.8$ Hz), 0.75 (t, 3H, $J=7.2$ Hz), 0.61 (d, 3H, $J=6.8$ Hz).

RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6): δ 174.0 (C=O), 171.1 (C=O), 136.0 (C_{arom}), 127.4 (C_{arom}), 123.4 (CH_{arom}), 120.7 (CH_{arom}), 118.4 (CH_{arom}), 118.0 (CH_{arom}), 111.1 (CH_{arom}), 110.0 (C_{arom}), 60.0 (CH), 52.9 (CH), 40.3 (CH_2), 31.0 (CH), 28.4 (CH_2), 22.1 (CH_2), 19.4 (CH_3), 16.5 (CH_3), 11.2 (CH_3).

5.2.5. Obtención del producto final, SucValTrpPr



Una disolución de la amina (827 mg, 2.403 mmol) en THF (65 mL) fue tratada a 0°C con carbonato de sodio (968 mg, 9.132 mmol, 3.8 eq.). La mezcla se agitó durante 15 minutos a 0°C, después con la ayuda de un embudo de adición compensada se le añadió gota a gota una solución de anhídrido succínico comercial (481 mg, 4.81 mmol, 2.0 eq.) en THF (40 mL). La mezcla resultante se agitó vigorosamente durante 16 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla fue concentrada a vacío, el residuo sólido blanco se disolvió en agua (50 mL), luego la disolución acuosa es extraída con cloroformo (50 mL x 2 veces). Seguidamente, la fase acuosa es extraída con AcOEt, observándose la formación de un precipitado blanco. El sólido fue filtrado a vacío y el residuo fue lavado con dietil éter. El compuesto final se secó en estufa de vacío durante toda la noche a 50°C. Rendimiento: 907 mg, 85%.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.76 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.64 (t, 1H, $J=5.6$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 7.29 (d, 1H, $J=8$ Hz), 7.09 (s, 1H), 7.04 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 6.96 (t, 1H, $J=7.6$ Hz), 4.47 (m, 1H), 4.07 (t, 1H, $J=6.8$ Hz), 3.08 (dd, 1H, $J=5.6$ Hz), 2.95 (m, 3H), 2.42 (dd, 4H, $J=5.2$ Hz), 1.93 (m, 1H), 1.32 (m, 2H), 0.80 – 0.67 (m, 9H).

RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- d_6): δ 174.0 (C=O), 171.7 (C=O), 170.9 (C=O), 170.7 (C=O), 136.0 (C_{arom}), 127.3 (C_{arom}), 123.4 (CH_{arom}), 120.8 (CH_{arom}), 118.3 (CH_{arom}), 118.1 (CH_{arom}), 111.2 (CH_{arom}), 110.1 (C_{arom}), 58.2 (CH), 53.5 (CH), 40.3 (CH_2), 30.4 (CH), 30.1 (CH_2), 30.0 (CH_2), 29.2 (CH_2), 27.6 (CH_2), 22.0 (CH_2), 19.0 (CH_3), 17.82 (CH_3), 11.20 (CH_3).

5.3. Determinación del pK_a

Las valoraciones potenciométricas fueron llevadas a cabo a 298 K. El procedimiento consistía en disolver 30 mg de SucValTrpPr en una solución de NaOH 0.05 M, la disolución resultante fue valorada con una solución comercial normalizada de HCl 0.1 M agitando vigorosamente. El ácido fue añadido usando una bomba de adición

“Just Infusion” modelo NE-300 MR (0.033 mL/min, diámetro interno 14.57 mm), se usó una jeringuilla analítica SGE hermética a los gases de 10 mL conectada a una aguja con *Luer Lock* de acero inoxidable (0.7 mm x 300 mm). El pH fue monitorizado cada 10 segundos con un pHmetro Mettler Toledo modelo S220 Seven Compact. Los datos de valoración obtenidos fueron tratados con el programa HYPERQUAD. Para evaluar el producto de solubilidad del derivado de ácido, la valoración fue detenida cuando se observó la formación de un precipitado. Luego, el producto de solubilidad se calculó iterativamente con el programa HYSS2009, ajustando los valores al pH calculado y experimental.

5.4. Preparación de los geles.

Para determinar la concentración mínima de gelación en todos los casos se fue reduciendo la cantidad de gelante que era capaz de gelar 1 mL de disolvente.

5.4.1. Método por calentamiento

Se pesan 10 mg del compuesto dentro de un vial de vidrio con tapón de cierre hermético (8 mL, diámetro 1.5cm), a continuación, se le añadió 1 mL de disolvente. La mezcla fue sonicada hasta obtener una dispersión homogénea y seguidamente el vial fue calentado usando una pistola de aire caliente (300°C) hasta obtener una disolución transparente. Finalmente, ésta disolución se dejó reposar a temperatura ambiente hasta observar la formación del gel (prueba del vial invertido = solvente no fluye cuando el vial es girado sobre sí mismo).

5.4.2. Método por precipitación

Se pesan 10 mg del compuesto dentro de un vial de vidrio con tapón de cierre hermético (4 mL, diámetro 1.3cm), a continuación, se le añadió 100 µL de DMSO. La mezcla fue sonicada hasta obtener disolución transparente. Finalmente, sobre ésta disolución se añadieron rápidamente 900 µL de agua destilada dejó reposar a temperatura ambiente hasta observar la formación del gel (solvente no fluye cuando el vial es girado sobre sí mismo).

5.4.3. Método por cambio de pH

Se disolvieron 10 mg del compuesto en 1 mL de NaOH 0.05M en un vial de vidrio con tapón de cierre hermético (4 mL, diámetro 1.3cm). A continuación, se añadieron 4 equivalentes de gluconolactona (con respecto a las mmoles de NaOH) y la mezcla se sonicó durante 10 segundos. Finalmente, las muestras se dejaron reposar durante 10 minutos, observándose la formación de un gel.

5.5. TEM

Las imágenes de transmisión electrónica fueron obtenidas usando un microscopio JEOL 2100 con pistola termoiónica LaB6 200 kV y equipado con una cámara CCD de alta resolución Gatan Orius. Las muestras de TEM fueron preparadas sobre gradillas de cobre *Formvar/Carbon film on 200 mesh*. El gel fue aplicado directamente sobre la gradilla y el exceso de solvente fue cuidadosamente removido por capilaridad usando un trozo de papel de filtro. Seguidamente, para tinter las muestras, se puso una gota de ácido fosfotúngstico al 1% en agua sobre la gradilla durante dos minutos.

5.6. DLS (*Dynamic light scattering*).

Las medidas de tamaño de las nanopartículas se realizaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés), se usó un Zetasizer Nano ZS (Malvern). Los análisis se llevaron a cabo usando un láser de He-Ne laser (633 nm) con un ángulo de dispersión de 1731. Se usó el modo de optimización y atenuación automática para todas las muestras, las medidas de las suspensiones de nanopartículas se hicieron con cubetas de plástico óptico (PMMA), marca Hellma Analytics de 3 mL de capacidad y 10 mm de paso óptico. Todas las lecturas se realizaron a 25°C.

5.7. Preparación de las nanopartículas.

Para la preparación y estudio de las nanopartículas se realizaron pruebas a diferentes pH. Se usaron tampones de fosfato 0.2M a pH de 4, 6 y 7.4. Todos los tampones fueron filtrados con filtros de celulosa regenerada de 0.2 micras.

Se preparó un stock de 25 mL de SucValTprPr 3 mM y a partir de ésta disolución se hicieron las correspondientes diluciones (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3mM). Tanto el stock como las diluciones se hicieron con el correspondiente tampón de fosfato 0.2M.

Para el SucValTpr6, se hicieron medidas a concentraciones de 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0mM a pH 7.4 y concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5mM a pH 6.

ANEXO

Anexo

6.1. Espectros RMN

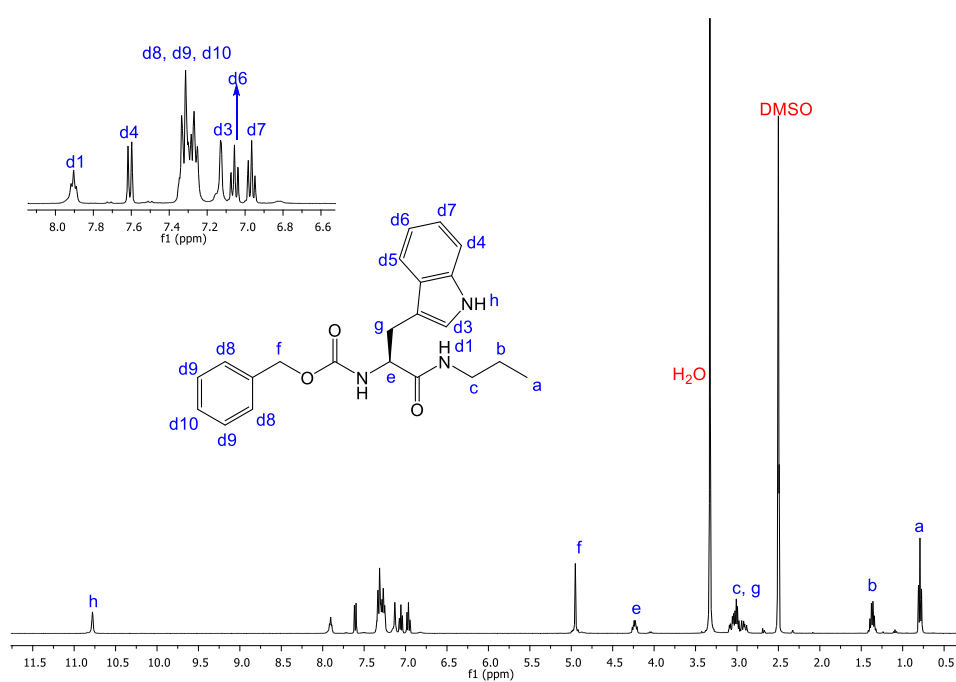


Figura 6.1. Espectro ^1H RMN ZTrpPr en $\text{DMSO}-d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

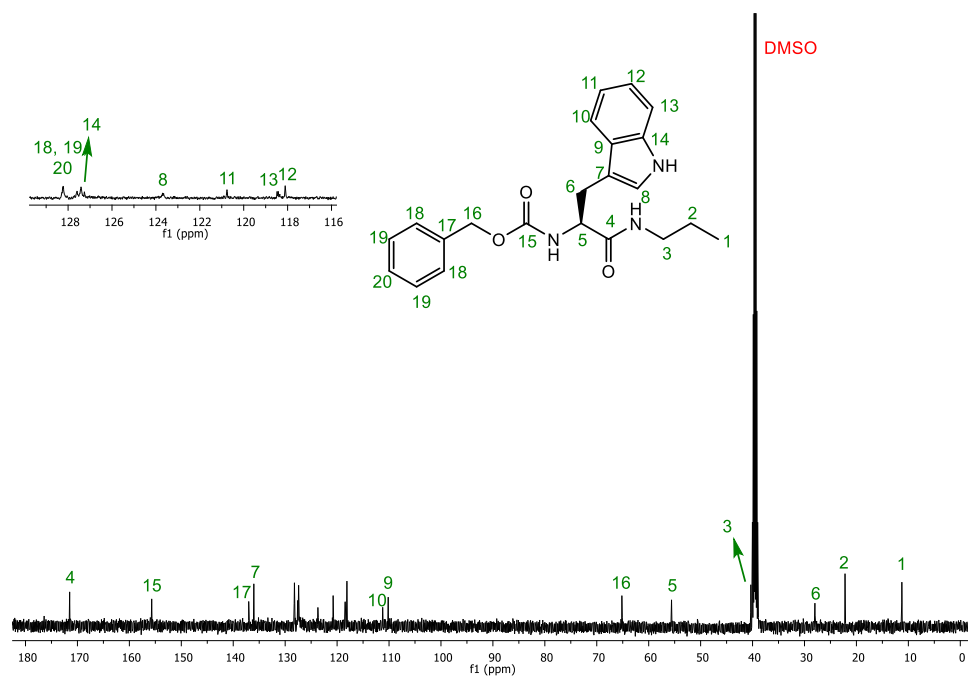


Figura 6.2. Espectro ^{13}C RMN ZTrpPr en $\text{DMSO-}d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

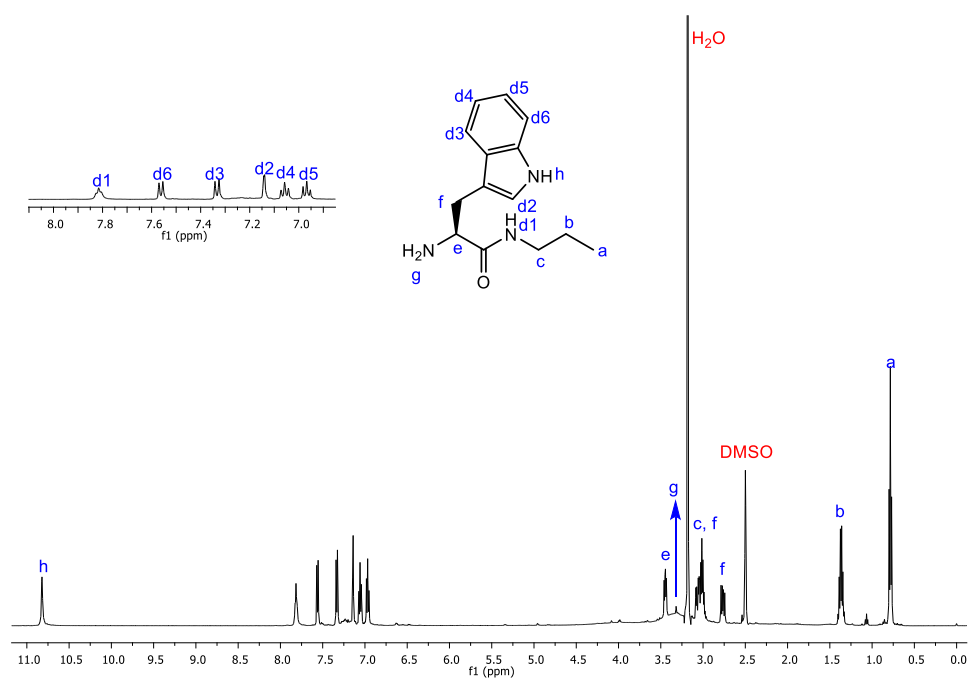


Figura 6.3. Espectro ^1H RMN HTrpPr en $\text{DMSO}-d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

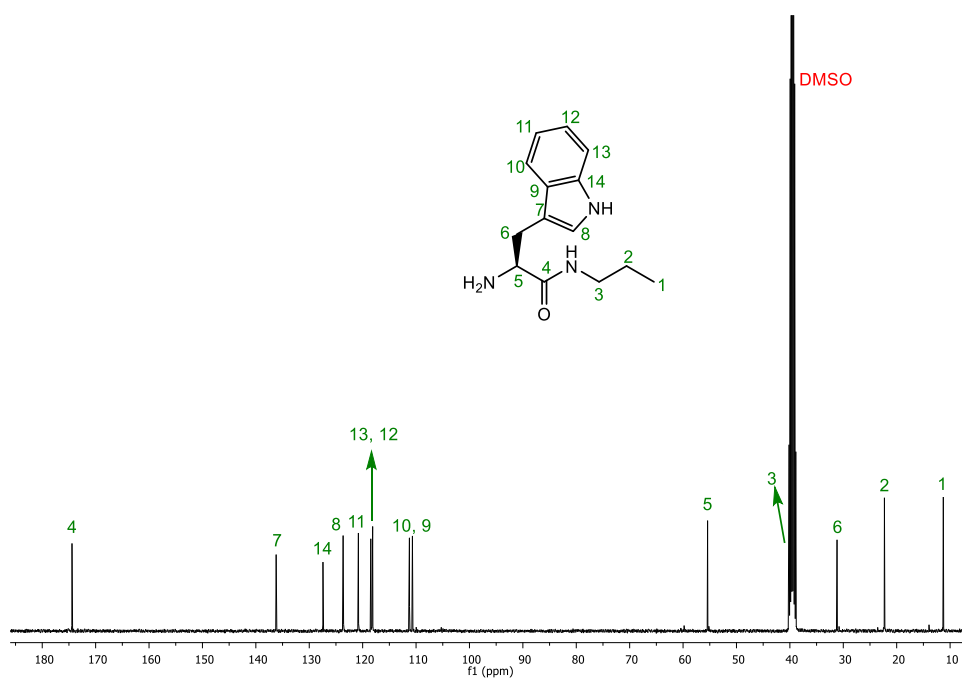


Figura 6.4. Espectro ^{13}C RMN HTpPr en $\text{DMSO-}d_6$.

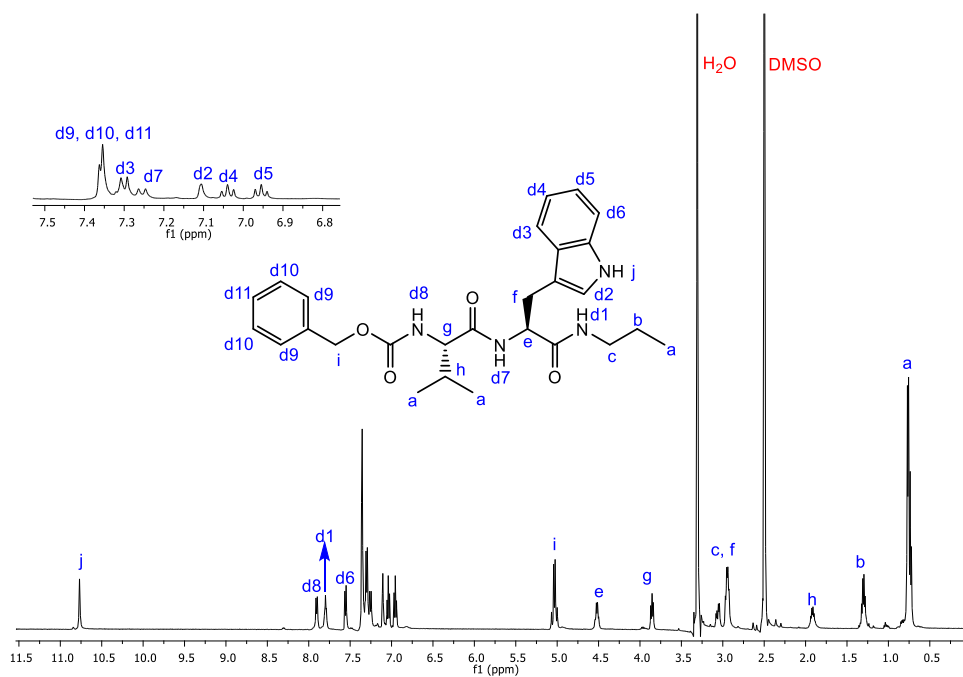


Figura 6.5. Espectro ^1H RMN ZValTrpPr en $\text{DMSO-}d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

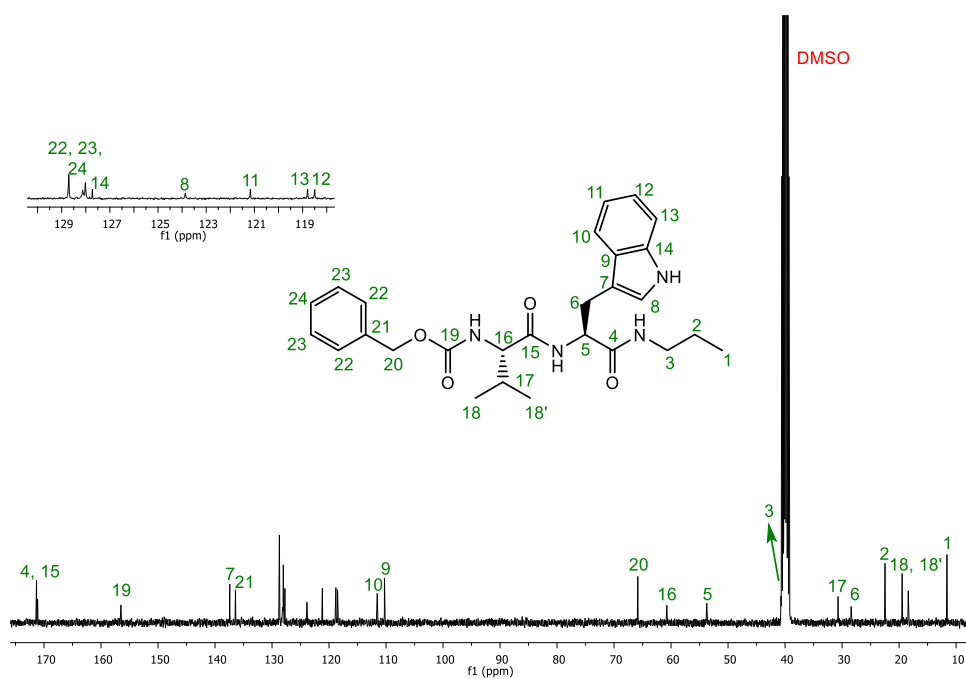


Figura 6.6. Espectro ^{13}C RMN ZValTrpPr en $\text{DMSO}-d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

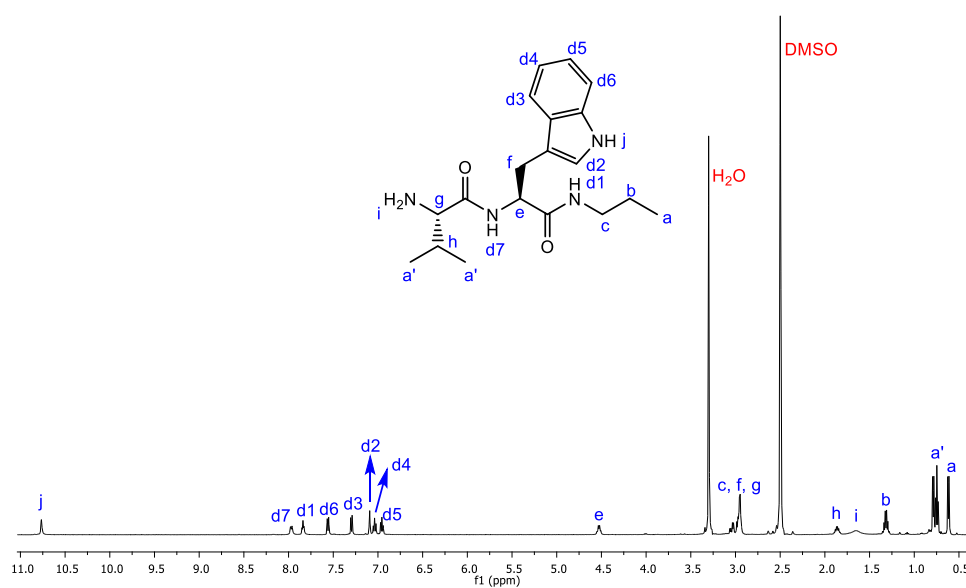


Figura 6.7. Espectro ^1H RMN HValTrpPr en $\text{DMSO}-d_6$.

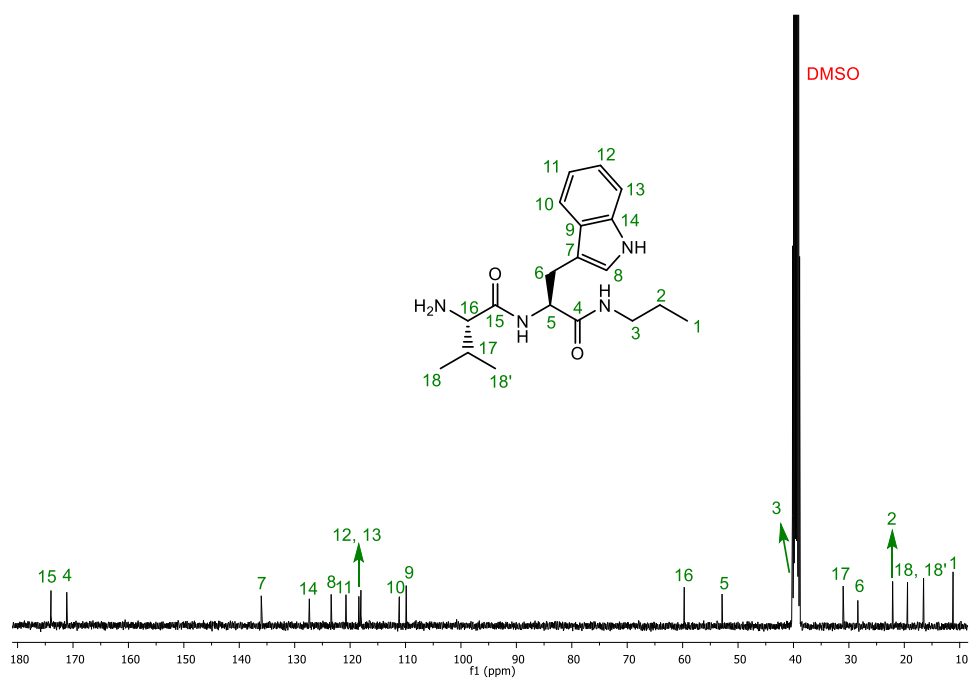


Figura 6.8. Espectro ^{13}C RMN HValTrpPr en $\text{DMSO-}d_6$.

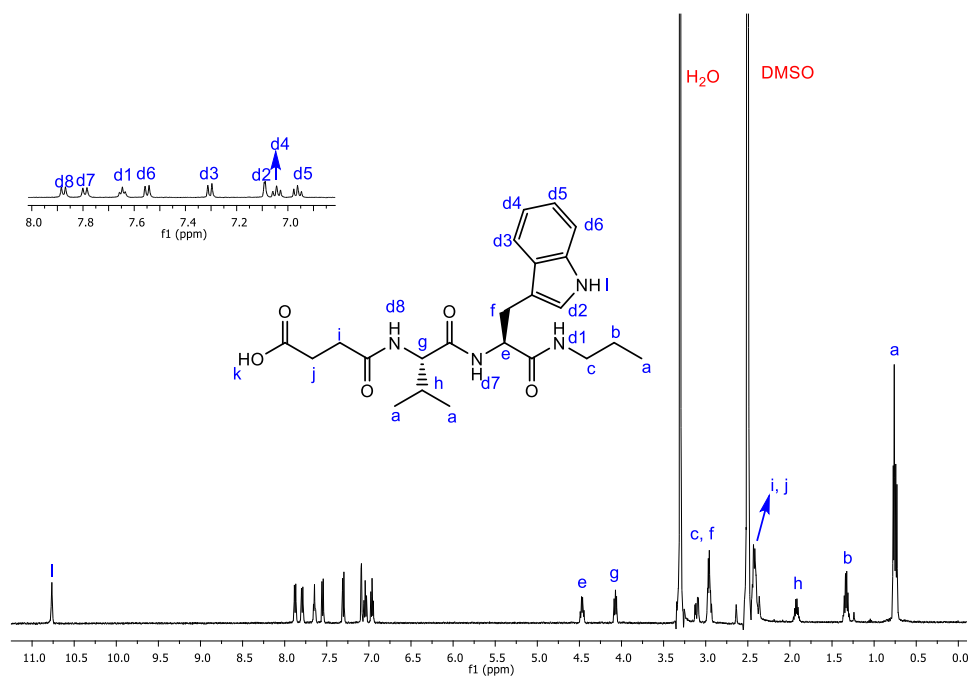


Figura 6.9. Espectro ^1H RMN SucValTrpPr en $\text{DMSO}-d_6$ con la zona de los aromáticos ampliada.

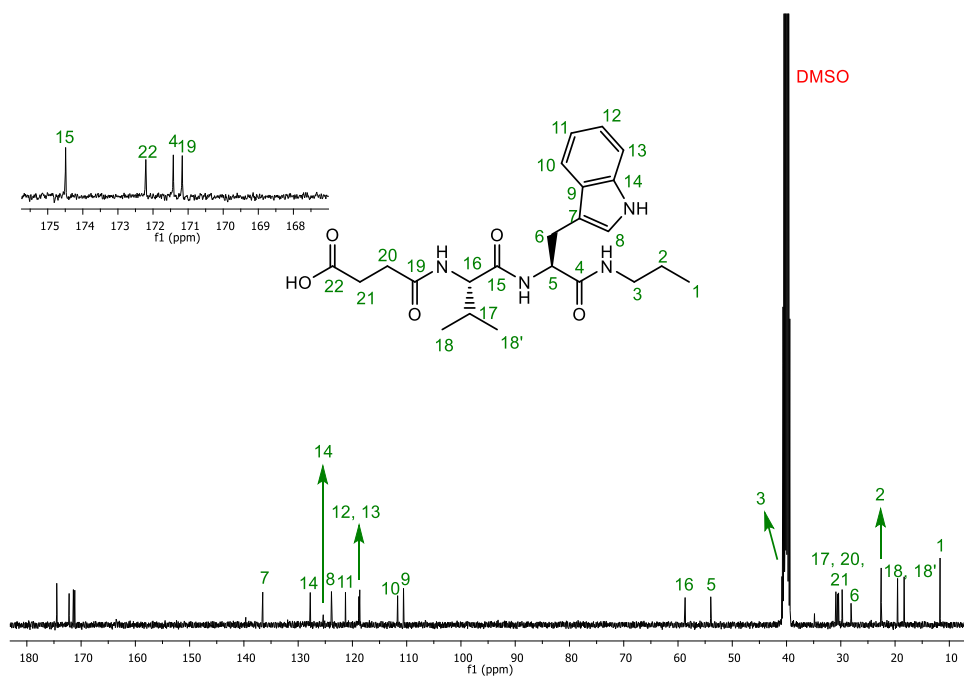


Figura 6.10. Espectro ^{13}C RMN SucValTrpPr en $\text{DMSO-}d_6$ con la zona de los carbonilos ampliada.

6.2. Correlogramas de los compuestos SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx

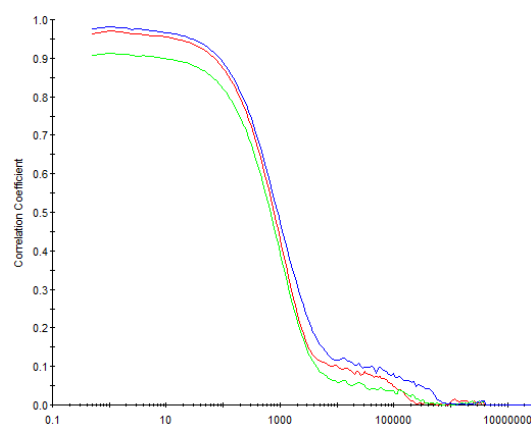


Figura 6.11. Correlograma de SucValTrpPr a pH 6 (3mM).

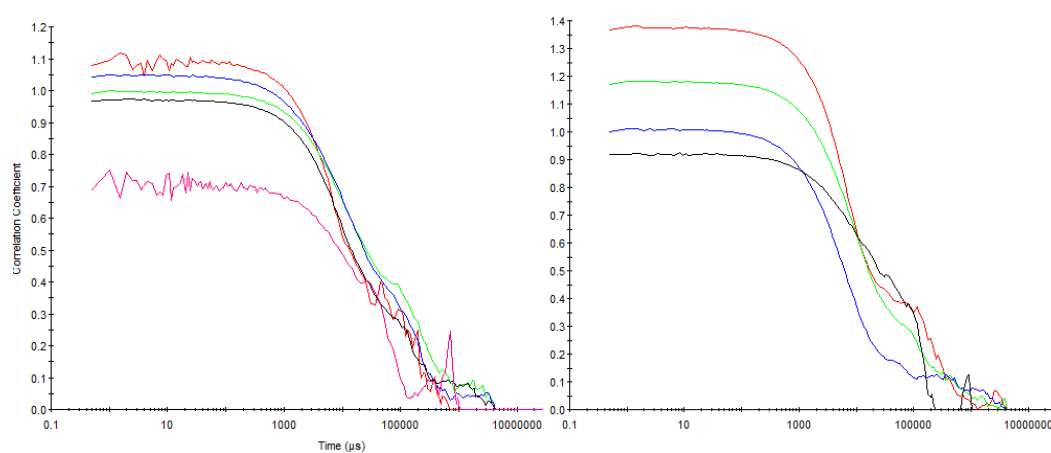


Figura 6.12. Correlograma de SucValTrpPr a pH 4 centrifugado (izquierda) y sin centrifugar (derecha) (3mM).

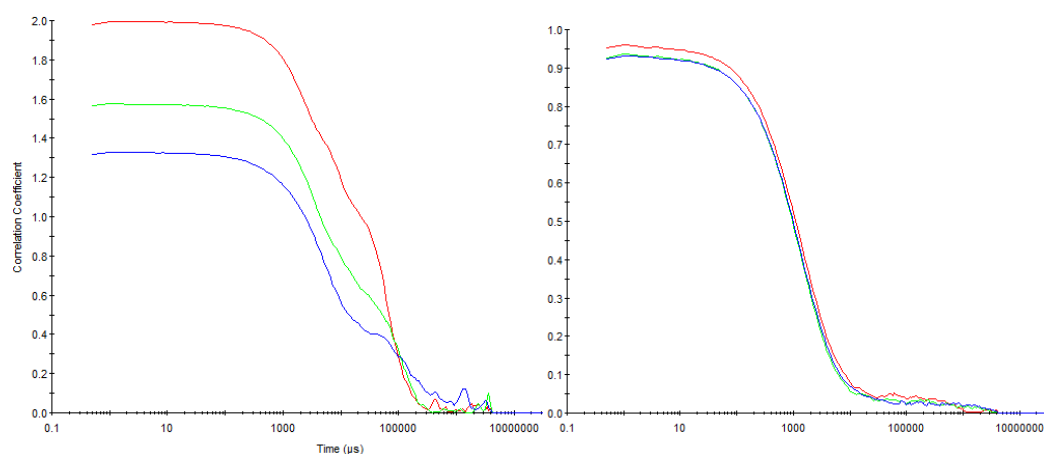


Figura 6.13. Correlograma de (SucValTrp)₂Hx a pH 6 sin centrifugar (izquierda) y centrifugado (derecha) (0.5mM).

6.3. Distribución de tamaño de SucValTrpPr y (SucValTrp)₂Hx obtenido por DLS

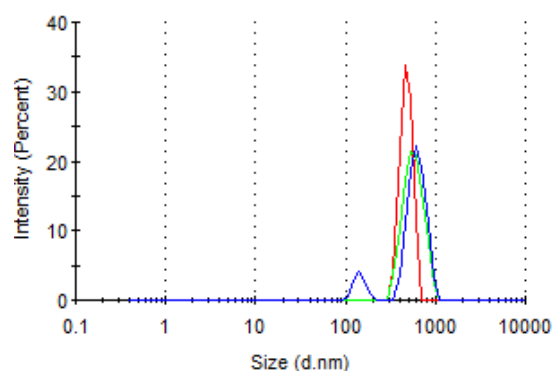


Figura 6.13. Distribución del tamaño de SucValTrpPr a pH 6 (3mM).

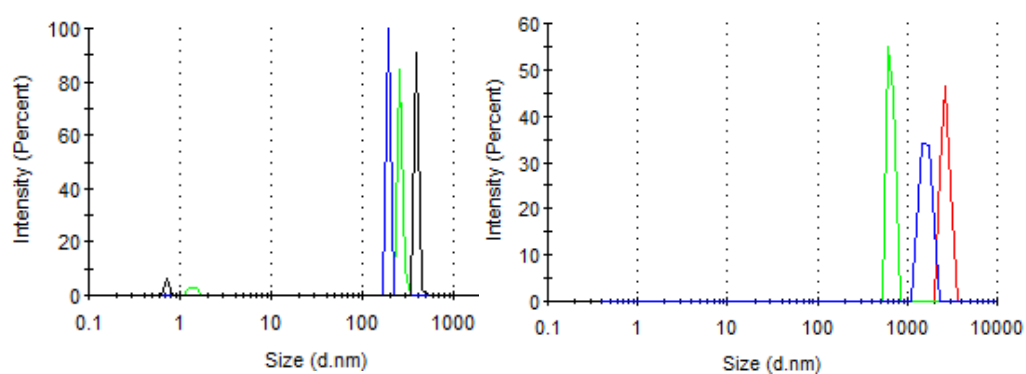


Figura 6.14. Distribución del tamaño de SucValTrpPr a pH 4 centrifugado (izquierda) y sin centrifugar (derecha) (3mM).

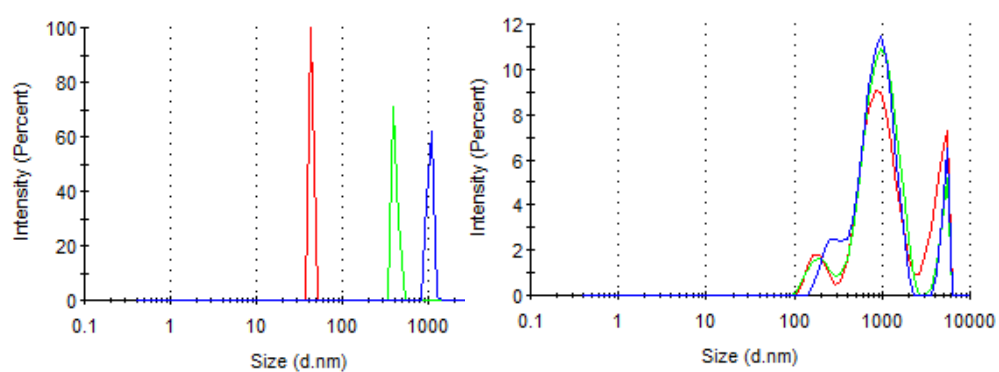


Figura 6.15. Distribución del tamaño de (SucValTrp)₂Hx a pH 6 sin centrifugar (izquierda) y centrifugando (derecha) (0.5 mM).

